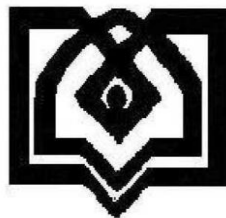




به نام خداوند جان و خرد
کزین برتر اندیشه برنگذرد



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین
دانشکده پزشکی شهید بابایی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی

عنوان پایان نامه

بررسی اثر آپوپتوتیک گیاه دارویی کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید

اساتید راهنما

دکتر مجتبی شهنازی، دکتر عباس آزادمهر

اساتید مشاور

دکتر رضا حاجی آقایی، دکتر محمود علیپور حیدری

نگارش

حمید رضا آقایی

سال تحصیلی: ۹۵ - ۹۶

شماره پایان نامه: ۷۱

تقدیم به :

روح پاک پدرم که چون شمع سوخت تا روشنی بخش راه دشوار زندگی ام باشد.

و به مادرم دیای بی کران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و

وجودش برایم همه کنج.

و به همسرم، اسطوره زندگیم، پناه محبتیم و امید بودم.

و به دخترانم که شاید تلاشم چراغ راهی باشد در مسیر رشد و بالندگیشان.

پاس نامه

ایزو منان را شاکرم که در راه کسب دانش یاریم کرد.

و از استاد فاضل و فرهیخته، جناب آقای دکتر شناسی

که در این راه از راهنمایی ها و ارشادات ایشان بهره‌ای وافر بردم

کمال تشکر را دارم.

و از اساتید ارجمند آقایان دکتر آزاد مهر، دکتر حاجی آقایی، دکتر علیپور

و دکتر سرائی پاسکزارم که از راهنمایی هایشان جهت انجام این تحقیق دریغ ننمودند.

همچنین از پرسنل محترم گروه انخل شناسی سرکار خانم صادقی و آقای باقری بابت

زحماتشان تشکر می‌کنم.

چکیده فارسی :

بررسی اثر آپوپتوتیک گیاه دارویی کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید

زمینه: گیاه *Ziziphora tenuior* بعنوان یک پروتواسکولیسیدال مناسب مشخص شده ولی مکانیسم اثر آن تا حال شناخته نشده است.

هدف: هدف از این مطالعه ارزیابی اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید می باشد.

مواد و روش ها: کبد گوسفندان آلوده به کیست هیداتید از کشتار گاه قزوین تهیه گردید. پروتواسکولکس ها با رعایت شرایط استریل جدا شده و *Viability* آنها با استفاده از آئوزین ۰/۱ درصد مشخص شد. پروتواسکولکس های مورد نیاز برای انجام آزمایش با استفاده از تست براد فورد مشخص شدند و با غلظت های مختلف از عصاره گیاه کاکوتی (۵mg/ml ، ۵۰ و ۱۰۰) در دمای ۳۷ درجه و حضور ۵٪ CO₂ به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. ارزیابی اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید و سنجش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ توسط گیاه مذکور، با استفاده از کیت های مربوطه و به روش الیزا انجام شد.

یافته ها: در این مطالعه غلظت های ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ عصاره گیاه کاکوتی در پروتواسکولکس های کیست هیداتید اثر آپوپتوتیک داشت که این اثر به ترتیب با ۳۲/۸٪ و ۴۰/۲٪ معنی دار بود. همچنین نتایج نشان داد که فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ نیز در غلظت های فوق به صورت معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$) (کاسپاز ۳ به ترتیب با ۲۹/۹۹ و ۳۶/۰۱ درصد و کاسپاز ۹ به ترتیب با ۱۵/۲۳ و ۴۵/۳۱ درصد).

نتیجه گیری: عصاره گیاه کاکوتی با افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹ از پروتواسکولکس های کیست هیداتید و اثر آپوپتوتیک بر روی آنها ، می تواند توجیه گر مکانیسم آپوپتوزیس در مرگ پروتواسکولکس ها باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد

کلمات کلیدی: کیست هیداتید، پروتواسکولکس، کاکوتی، آپوپتوزیس، کاسپاز

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول

۱.....	مقدمه
۲.....	اهمیت اکینوкокوس و بیماری هیداتیدوز
۲.....	تاریخچه شناسایی اکینوкокوس و بیماری هیداتیدوزیس
۳.....	تاکسونومی اکینوкокوس
۳.....	مشخصات مرفولوژیک و بیولوژیک اکینوкокوس گرانولوزوس
۳.....	کرم بالغ
۴.....	تخم اکینوкокوس
۶.....	مرحله لاروی یا متاستود
۵.....	غشاء مطبق (Laminated Layer)
۶.....	لایه زایا (Germinal Layer)
۶.....	مایع کیست
۷.....	کپسولهای جوانه ای (Brood Capsules)
۷.....	کیست های دختر (Daughter Cysts)
۸.....	چرخه زندگی اکینوкокوس گرانولوزوس
۱۰.....	انتشار جغرافیایی اکینوкокوس گرانولوزوس و هیداتیدوز در جهان
۱۲.....	انتشار جغرافیایی اکینوкокوس گرانولوزوس و هیداتیدوز در ایران

بیماریزایی و علائم بالینی هیداتیدوز	۱۴
روش های تشخیصی هیداتیدوز	۱۵
تشخیص کلینیکی	۱۵
تشخیص رادیولوژیک	۱۵
تشخیص ایمونولوژیک	۱۶
تشخیص افتراقی	۱۷
کنترل و پیشگیری هیداتیدوز	۱۷
درمان هیداتیدوز	۱۸
درمان دارویی	۱۸
درمان جراحی	۱۹
روش درمانی PAIR	۱۹
ریشه کنی ضایعات با استفاده از حرارت حاصله از امواج رادیویی	۲۰
پاسخ های ایمنی در برابر کیست هیداتید	۲۰
آنتی ژن های اکینوкокوس	۲۰
ایمنی ذاتی	۲۱
ایمنی همورال	۲۲
ایمنی سلولار	۲۲
آپوپتوزیس و مکانیسم های آن در هیداتیدوز	۲۳
مسیرهای آپوپتوزیس	۲۴
مسیر خارجی یا آپوپتوز القاء شده توسط گیرنده های مرگ	۲۴

مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپتوزیس ۲۴

کاسپازها ۲۶

بیان مساله ۲۷

فصل دوم

مروری بر متون ۲۹

گیاه کاکوتی (*Ziziphora tenuior*) ۲۹

فصل سوم

اهداف و فرضیات ۳۸

هدف اصلی طرح ۳۸

اهداف فرعی ۳۸

اهداف کاربردی ۳۸

فرضیه ها (Hypothesis) یا سؤال های پژوهش ۳۸

نوع مطالعه ۴۰

بررسی های آماری ۴۰

فصل چهارم

مواد و روش ها ۴۱

تجهیزات مورد نیاز ۴۱

وسایل مصرفی ۴۲

محلول ها و مواد مصرفی ۴۲

کیت های مورد نیاز ۴۳

۴۳.....	روش کار
۴۳.....	تهیه عصاره گیاهی
۴۴.....	تهیه کیست های هیداتید و جدا سازی پروتواسکولکس ها
۴۶.....	تعیین تعداد مناسب پروتواسکولکس ها جهت مواجهه با عصاره گیاه کاکوتی
۴۸.....	تعیین میزان پروتئین مایع رویی حاصل از لیز پروتواسکولکس ها، با استفاده از روش براد فورد
۵۱.....	تهیه رقت های مورد نیاز از عصاره گیاه دارویی کاکوتی
۵۲.....	روش انجام آزمایش آپوپتوزیس بر اساس کیت: Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} (Roche)
۵۴.....	آماده کردن محلول های کار آزمایش آپوپتوز (Working solutions)
۵۷.....	روش انجام آزمایش الایزا جهت بررسی آپوپتوزیس
۵۸.....	روش اندازه گیری فعالیت کاسپاز های ۳ ، ۸ و ۹ بر اساس کیت های شرکت abcam
۵۸.....	محتویات کیت ها و آماده کردن محلول ها
۶۰.....	خلاصه اندازه گیری

فصل پنجم

۶۲.....	یافته ها
---------	----------

فصل ششم

۸۱.....	بحث
۸۹.....	نتیجه گیری
۹۰.....	پیشنهادهات

فصل هفتم

۹۱.....	منابع
---------	-------

فهرست تصاویر

- تصویر ۱ : نمای کرم بالغ اکینوکوکوس گرانولوزوس ۴
- تصویر ۲ : تخم اکینوکوکوس گرانولوزوس ۵
- تصویر ۳ : ساختمان کیست هیداتید ۷
- تصویر ۴ : چرخه زندگی اکینوکوکوس گرانولوزوس ۹
- تصویر ۵ : توزیع جغرافیایی هیداتیدوز در جهان ۱۲
- تصویر ۶ : مسیر های فعال شدن آپوپتوزیس و کاسپاز های دخیل در این مسیر ها ۲۵
- تصویر ۷ : گیاه کاکوتی (برگ) ۳۶
- تصویر ۸ : گیاه کاکوتی (گل) ۳۷
- تصویر ۹ : پروتواسکولکس های زنده اکینوکوکوس گرانولوزوس قبل از مواجهه با عصاره گیاه کاکوتی ۴۵
- تصویر ۱۰ : روش تهیه رقت های سریالی از پروتواسکولکس ها ۴۷
- تصویر ۱۱ : کیت تشخیص مرگ سلولی (آپوپتوزیس) Cell Death Detection ELISA^{PLUS} ۵۶
- تصویر ۱۲ : پروتواسکولکس های مرده اکینوکوکوس گرانولوزوس بعد از مواجهه با عصاره گیاه کاکوتی ۶۱

فهرست جداول

- جدول ۱ : متغیرها..... ۳۹
- جدول ۲ : محلول های لازم و مقادیر آنها برای رسم منحنی استاندارد تست براد فورد..... ۴۸
- جدول ۳ : محلول های لازم و مقادیر آنها برای تعیین میزان پروتئین مایع رویی حاصل از پروتواسکولکس ها ۴۹
- جدول ۴ : اثر آپوتوتیک غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها..... ۶۳
- جدول ۵ : اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ، درافزایش فعالیت کاسپاز ۳ ۶۷
- جدول ۶ : اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ، درافزایش فعالیت کاسپاز ۹ ۷۰
- جدول ۷ : اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ، درافزایش فعالیت کاسپاز ۸ ۷۳
- جدول ۸ : اثر مقایسه ای آپوتوتیک غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها (تست Tukey) ۷۷
- جدول ۹ : اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳، (تست Tukey) ۷۸
- جدول ۱۰ : اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹، (تست Tukey) ... ۷۹
- جدول ۱۱ : اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸، (تست Tukey) ۸۰

فهرست منحنی و نمودار ها

- منحنی ۱ : منحنی کالیبراسیون تست براد فورد ۵۰
- نمودار ۱ : اثر آپتوتیک عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها بر اساس میزان جذب نوری ۶۴
- نمودار ۲ : اثر آپتوتیک عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها بر حسب درصد ۶۵
- نمودار ۳ : اثر عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر حسب جذب نوری ۶۸
- نمودار ۴ : اثر عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر حسب درصد ۶۹
- نمودار ۵ : اثر عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بر حسب جذب نوری ۷۱
- نمودار ۶ : اثر عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بر حسب درصد ۷۲
- نمودار ۷ : اثر عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ بر حسب جذب نوری ۷۴
- نمودار ۸ : اثر عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ بر حسب درصد ۷۵

فصل اول

مقدمه:

اکینوкокوس^۱ کرم انگلی متعلق به شاخه سستودها و عامل ایجاد بیماری هیداتیدوزیس^۲ یا اکینوкокوزیس^۳ می باشد. این انگل کوچکترین کرم نواری است که مرحله بلوغ خود را در روده گروهی از گوشتخواران اهلی و وحشی (به عنوان میزبان نهایی) سپری می کند. مرحله لاروی این انگل (کیست هیداتید) در اندامهای مختلف حیوانات علفخوار (به عنوان میزبان واسط) ایجاد می شود (۱-۳). مرحله لاروی این انگل علاوه بر حیوانات علفخوار می تواند در انسان نیز ایجاد شود (۴). یکی از موثرترین روش های درمانی کیست هیداتید، روش های جراحی است. لذا انتخاب مواد پروتواسکولیسیدال موثر و کم ضرر و تزریق آنها به داخل کیست ها که بتواند خطر نشت پروتواسکولکس های زنده را کاهش دهد، برای جراحان از اهمیت زیادی برخوردار است (۳-۶). تاکنون اسکولکس کش های شیمیایی زیادی به کار گرفته شده است که اخیرا بعلت عوارض بیشمار مواد مذکور، استفاده از آنها محدود شده، و استفاده از گیاهان دارویی با عوارض کمتر مورد توجه قرار گرفته است (۶-۸). یکی از مسیرهای جدید ایمنی ذاتی و ناشناخته میزبان علیه کیست هیداتیک، آپوپتوزیس می باشد (۹)، (۱۰). همچنین آپوپتوزیس به عنوان بخش مهمی از ایمنی ذاتی میزبان در سرکوب انگل به اثبات رسیده است (۱۱). پژوهش های جدید نشان داده است که آپوپتوزیس می تواند یکی از بهترین روشها در از بین بردن انگلهای اکینوкокوس گرانولوزوس باشد (۱۲). اثر پروتواسکولیسیدال گیاهان دارویی مختلف از جمله گیاه دارویی کاکوتی (*Ziziphora tenuior*) طی تحقیقات انجام شده قبلی مشخص شده (۱۳)، اما مکانیسم اثر این گیاهان منجمله توانایی آنها در القاء آپوپتوزیس، می تواند زمینه تحقیقات جدیدتر باشد.

¹-*Echinococcus*

²-*Hydatidosis*

³-*Echinococcosis*

اهمیت اکینوкокوس و بیماری هیداتیدوز:

هیداتیدوز یکی از مهمترین بیماریهای زئونوز بوده و در بین بیماریهای انگلی از جایگاه ویژه ای برخوردار می باشد. این بیماری انتشار جهانی داشته و از اغلب کشورهای جهان گزارش شده است. ابتلاء انسان از طریق خوردن تخم کرم، همراه با سبزیجات، مواد غذایی و آب آلوده به مدفوع سگ اتفاق می افتد. این بیماری سالیانه خسارت های اقتصادی و بهداشتی فراوانی به کشورهای مختلف جهان تحمیل می کند. آلودگی دام ها به هیداتیدوز می تواند منجر به کاهش قابل ملاحظه محصولات دامی نظیر شیر، گوشت، پشم و همچنین باعث ضبط و معدوم شدن اندام های آلوده دامها در کشتارگاهها شود. گروهی از پژوهشگران اهمیت بهداشتی هیداتیدوز را بر اهمیت اقتصادی آن مقدم می دانند (۵). این بیماری در ایران به صورت اندمیک و هیپراندمیک وجود داشته و یکی از مهمترین بیماری های زئونوز محسوب می شود. استفاده از روشهای سنتی دامپروری در ایران به خصوص در میان عشایر، و بهره برداری از سگ در کنار گله که اغلب با عدم رعایت اصول بهداشتی همراه است، این بیماری را به یکی از مهمترین معضلات بهداشتی و اقتصادی کشور تبدیل نموده است (۱۴).

تاریخچه شناسایی اکینوкокوس و بیماری هیداتیدوزیس:

آلودگی انسان به مرحله لاروی انگل، از زمانهای قدیم، پیش از آن که به طور رسمی توصیف شود، شناخته شده بود. چنانکه بقراط در رساله بیماری های داخلی خود از این بیماری نام برده است. در قرن اول میلادی، ارسطو و جالینوس کیست هیداتید را شناخته اند. زکریای رازی هم در نوشته های خود به این بیماری اشاره کرده است. برای اولین بار، Redi در سال ۱۶۸۴، Hartman در سال ۱۶۸۵ و Tyson در سال ۱۶۹۱ به طبیعت حیوانی آن مشکوک شدند. در سال ۱۷۶۶ Pallas، شباهت بیماری هیداتید در انسان و دیگر پستانداران را شرح داد و ضمن ترسیم کیست های هیداتید حاصله از احشاء موش، آنها را با کیست های به دست آمده از انسان مقایسه نمود. Goeze در سال ۱۷۸۲، شباهت پروتواسکولکس های کیست هیداتید را با پروتواسکولکس های سایر تیناها نشان داد. Hartman در سال ۱۶۹۵، Rudolphi در سال ۱۸۵۲ و

دانشمندان دیگر از جمله Leukart ، Haubner ، Kuchenmeister و Netlleship در سال های بعد، پروتواسکولکس های به دست آمده از کیست های هیداتید میزبان های واسط را به سگ خوراندند و رشد و نمو کرم های بالغ در روده سگ را مشاهده کردند. در سال ۱۸۷۳، Naunyn در آلمان و Krabbe در ایسلند و در سال ۱۸۵۵، Thomas در استرالیا، بعد از خوراندن پروتواسکولکس های کیست های انسانی به سگ، کرم های بالغ انگل را از روده سگ، جدا کردند (۷). فرم بالغ این انگل در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۳۴ هجری شمسی توسط مکاره چیان و جانبخش از سگ های ولگرد تهران گزارش شده است (۱۵).

تاکسونومی اکینوкокوس

جنس *Echinococcus* به ترتیب متعلق به سلسله *Animalia*، شاخه *Platyhelminthes*، رده *Cestoda*، زیر رده *Eucestoda*، راسته *Cyclophylidae* و خانواده *Taenidae* می باشد (۴). در جنس مذکور شش گونه شناخته شده است که عبارتند از اکینوкокوس گرانولوزوس^۱، اکینوкокوس مولتی لوکولاریس^۲، اکینوкокوس الیگارتوس^۳، اکینوкокوس ووژلی^۴، اکینوкокوس شیکوئیکوس^۵ اکینوкокوس فلیدیس^۶. مرحله لاروی و بالغ این گونه ها از نظر مرفولوژیکی با یکدیگر متفاوت می باشند (۴، ۱۶). بررسی های نژادی و جغرافیایی نشان دهنده ارتباط نزدیک سوبه فلیدیس و گرانولوزوس می باشد (۱۷).

مشخصات مرفولوژیک و بیولوژیک اکینوкокوس گرانولوزوس

کرم بالغ:

اندازه کرم بالغ ۳-۹ میلیمتری بوده و دارای سر یا اسکولکس مجهز به چهار بادکش و یک رستلوم با ۴۰-۲۸ قلاب است که در دو ردیف قرار دارند. بعد از سر، گردن و بندها (۳-۵ بند) قرار دارند. بند اول یا بندهای

¹- *E. granulosus*

²- *E. multilocularis*

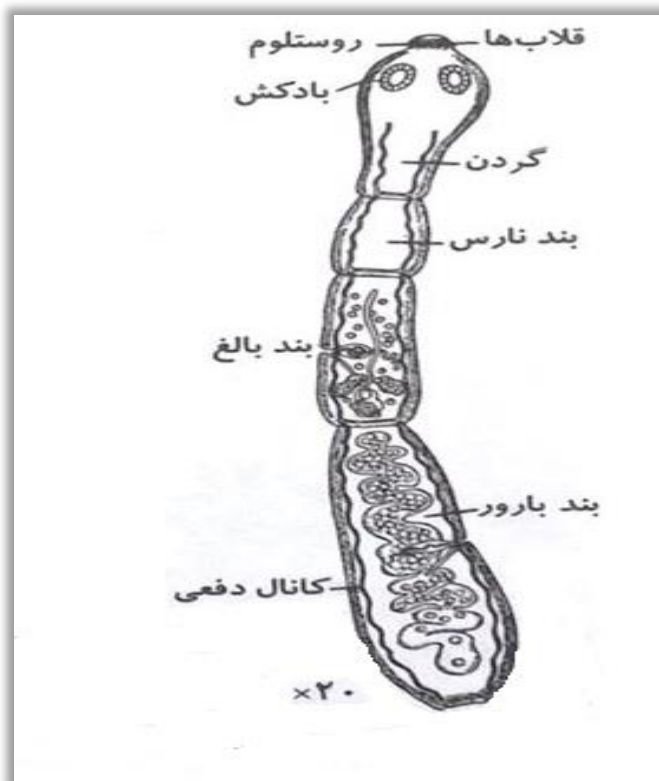
³- *E. oligarthus*

⁴- *E. vogeli*

⁵- *E. shiquicus*

⁶- *E. felidis*

اول و دوم معمولاً نارس، بند ما قبل آخر رسیده و بند آخر بارور بوده و دارای یک رحم پر از تخم با ۱۵-۱۲ انشعاب کوتاه جانبی می باشد. طول بند بارور حدود نصف طول کرم بالغ بوده و حاوی حدود ۶۰۰ تخم می باشد. منافذ تناسلی، به طور متناوب و نامرتب در بخش جانبی بندها قرار دارند (۱۸، ۱۹).



تصویر ۱: نمای کرم بالغ اکینوکوکوس گرانولوزوس

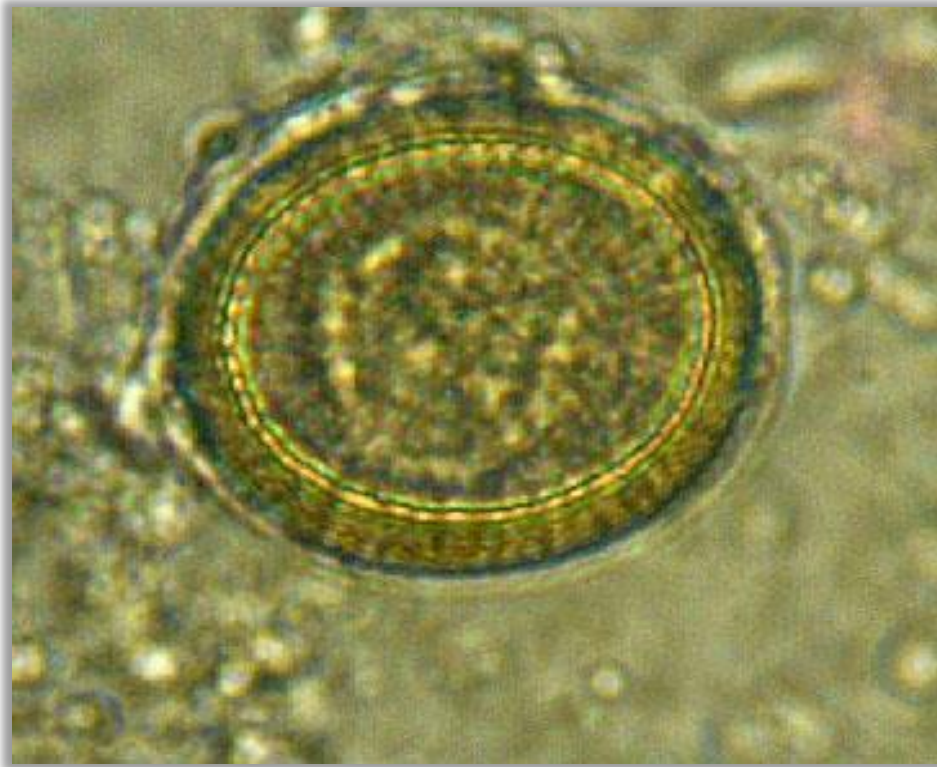
تخم اکینوکوکوس: در هر بند بارور، حدوداً ۶۰۰ عدد تخم وجود دارد. که شکل آن گرد متمایل به بیضی بوده و اندازه آن ۳۰-۳۷ میکرون می باشد. جدار خارجی تخم ضخیم و مخطط بوده و به نام امبریوفور^۱ نامیده می شود (۷). در داخل تخم جنینی به نام انکوسفر^۲ وجود دارد که ۶ قلاب داشته و هگزاکانت^۳ هم

^۱- Embryophore

^۲- Oncosphere

^۳- Hexacanth

نامیده می شود(۲۰). تخم این انگل از تخم سایر سستود های خانواده تنیده غیرقابل تفکیک بوده و به مدت ۱۲-۶ ماه می تواند در خاک زنده مانده و قادر است انسان و علفخواران را آلوده نماید (۱۹، ۲۱).



تصویر ۲ : تخم اکینوкокوس گرانولوزوس

مرحله لاروی یا متاسستود^۱:

متاسستود، مرحله لاروی انگل اکینوкокوس گرانولوزوس بوده که در داخل بدن میزبان واسط بوجود می آید. به لارو مذکور، کیست هیداتید هم گفته می شود. کیست هیداتید دو لایه دارد که توسط یک لایه محاط کننده در بر گرفته می شود. معمولاً قطر کیست ها به ۷-۱ و گاهی به ۲۰ سانتیمتر می رسد. لایه

¹⁻ Metacestode

محاط کننده کیست، در واقع لایه فیبروز و بی جانی است که در اثر واکنش میزبان علیه انگل ایجاد میشود (تصویر ۳). لایه های کیست هیداتید از خارج به داخل عبارت است از:

غشاء مطبق (Laminated Layer):

لایه بیرونی کیست به نام لایه کوتیکولی، غشاء مطبق و یا لایه هیالینی نامیده می شود که لایه ای سفیدرنگ، بدون سلول، کیتینی و متشکل از لایه های متحدالمرکز از جنس پلی ساکاریدی باشد. لایه مذکور به ضخامت ۱-۲ میلیمتر بوده و از لایه زایا ایجاد می شود.

لایه زایا (Germinal Layer):

لایه داخلی یا غشاء زایا، یک لایه نازک متشکل از سلول های جنینی هسته دار و به ضخامت حدود ۵ میکرون می باشد. عمل این لایه، تولید و توسعه اجزای کیست می باشد (۱۶، ۲۲). در داخل حفره ای که توسط لایه های کیست احاطه شده است، اجزای دیگر کیست، به شرح زیر وجود دارند:

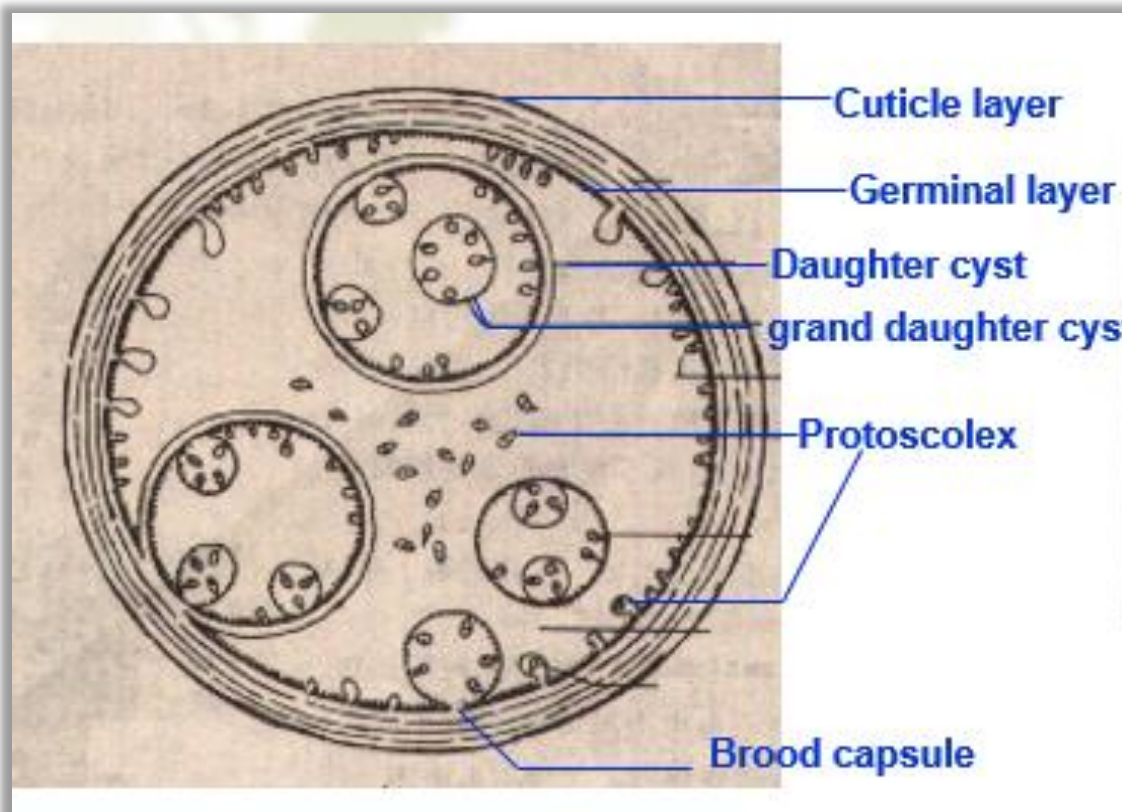
مایع کیست:

مایعی بی رنگ یا زرد کمرنگ بوده که می تواند باعث اتساع غشاهای محدودکننده کیست شود. میزبان و انگل، هر دو در تولید مایع مذکور نقش دارند. ترکیب مایع، مشابه سرم میزبان و دارای وزن مخصوص ۱/۰۰۸ تا ۱/۰۱۵ PH قلیایی است. مایع هیداتید متشکل از ترکیبات مختلف از جمله املاح و آنزیم های متنوع، اسید اوریک، نیتروژن، اوره، کراتی نین، DNA، RNA، کلسترول، تری گلیسیرید، گلوکز، پروتئین و مواد توکسیک می باشد (۲۲-۲۴).

کپسولهای جوانه ای (Brood Capsules) :

کپسولهای جوانه ای دارای لایه زایا بوده و باعث ایجاد پروتواسکولکس ها می شوند. که هر یک از آنها قادرند به یک کرم بالغ تبدیل شوند.

کیست های دختر (Daughter Cysts): این کیست ها از کیست های مادر و درون آن ها به وجود می آیند. کیست های دختر مشابه کیست های اصلی (مادر) بوده ولی از نظر اندازه، کوچکتر هستند. درون کیست های دختر هم کپسولهای زایا ایجاد می شوند. هر کیست هیداتید حدوداً حاوی ۲ میلیون پروتواسکولکس می باشد. گاهی کپسولهای جوانه ای پاره شده و پروتواسکولکس ها آزاد می شوند و در اثر رسوب در ته مایع کیست، تشکیل شن هیداتید می دهند (۱۸).

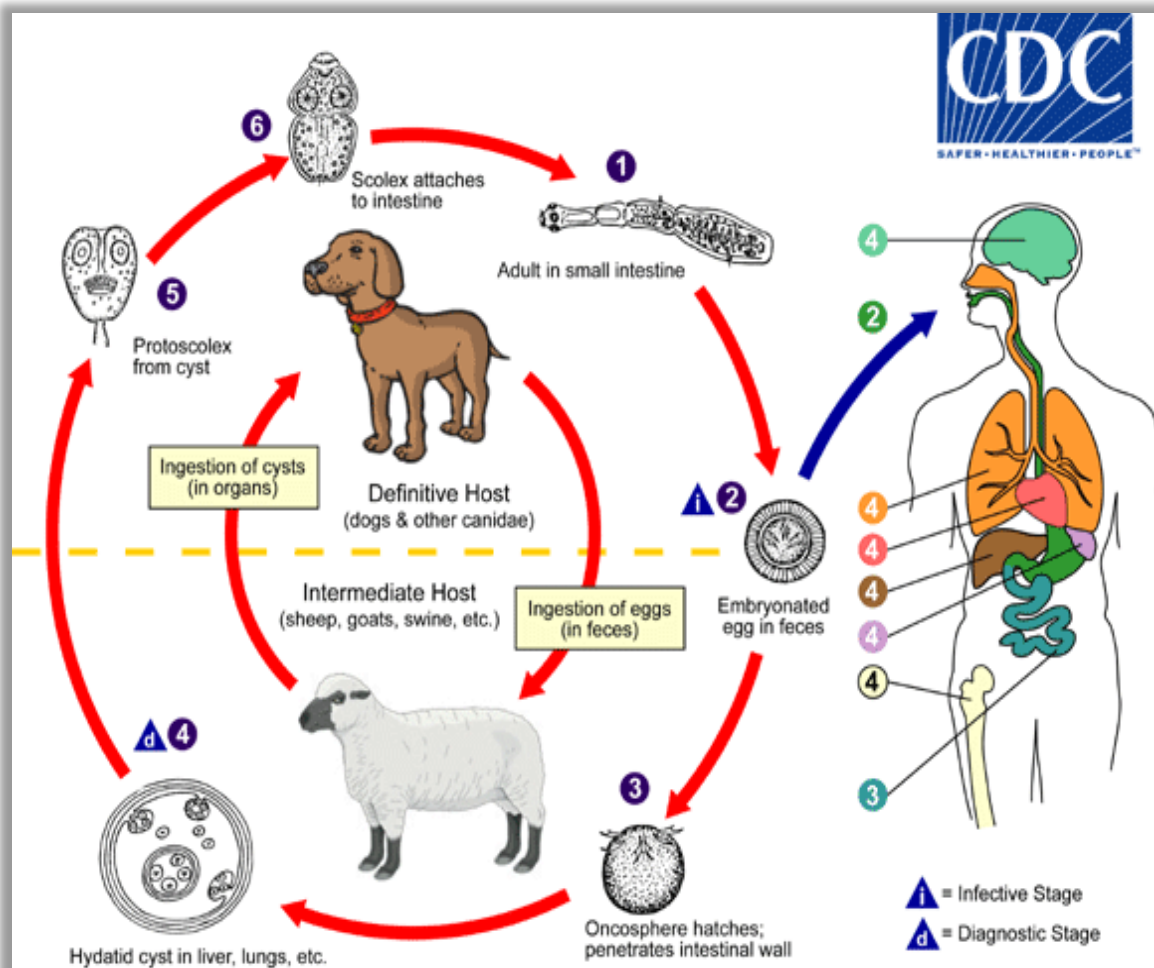


تصویر ۳: ساختمان کیست هیداتید

چرخه زندگی اکینو کوکوس گرانولوزوس:

محل جایگزینی انگل های بالغ، روده باریک میزبان های اصلی (سگ سانان) از جمله سگ می باشد. بندهای بارور انگل در روده سگ باز شده و تخم ها از طریق مدفوع حیوان، وارد محیط می شوند و قادرند به مدت ۲۰۰ روز در ۷ درجه سانتیگراد، ۵۰ روز در ۲۱ درجه سانتیگراد و چند ساعت در ۴۰ درجه سانتیگراد زنده بمانند. تخم های موجود در چراگاهها به وسیله میزبان های واسط (علف خوران) از جمله گوسفند خورده شده و پس از باز شدن تخم انگل در دئودنوم حیوانات مذکور، در اثر عمل پانکراتین و تریپسین امبریفور هضم شده و انکوسفرها با عمل نمک های صفراوی فعال شده و از قلابچه ها برای نفوذ به مخاط بدن و رسیدن به عروق خونی استفاده می کنند و از طریق جریان خون به اندام های مختلف (بعلت فیلترینگ مویرگی تا ۷۶٪ به کبد) می رسند. قلابچه ها در این نواحی ناپدید شده و به تدریج به کیست تبدیل می شوند. در چرخه زندگی این انگل، انسان میزبان واسط اتفاقی بوده و در اثر خوردن مواد آلوده به تخم کرم به کیست هیداتید مبتلا می شود (تصویر ۴). در صورت کشتار غیر بهداشتی دام های آلوده به کیست هیداتید و خوردن اندام های حاوی کیست توسط سگ ها، هر پروتواسکولکس می تواند طی ۶ الی ۷ هفته در روده حیوان مذکور به کرم بالغ تبدیل شود (۱۸).

آلودگی به کرم بالغ علاوه بر سگ ها، از گوشتخواران وحشی از جمله گرگ، شغال زرد و روباه نیز گزارش شده است (۲۵، ۲۶).



تصویر ۴: چرخه زندگی اکینوкокوس گرانولوزوس

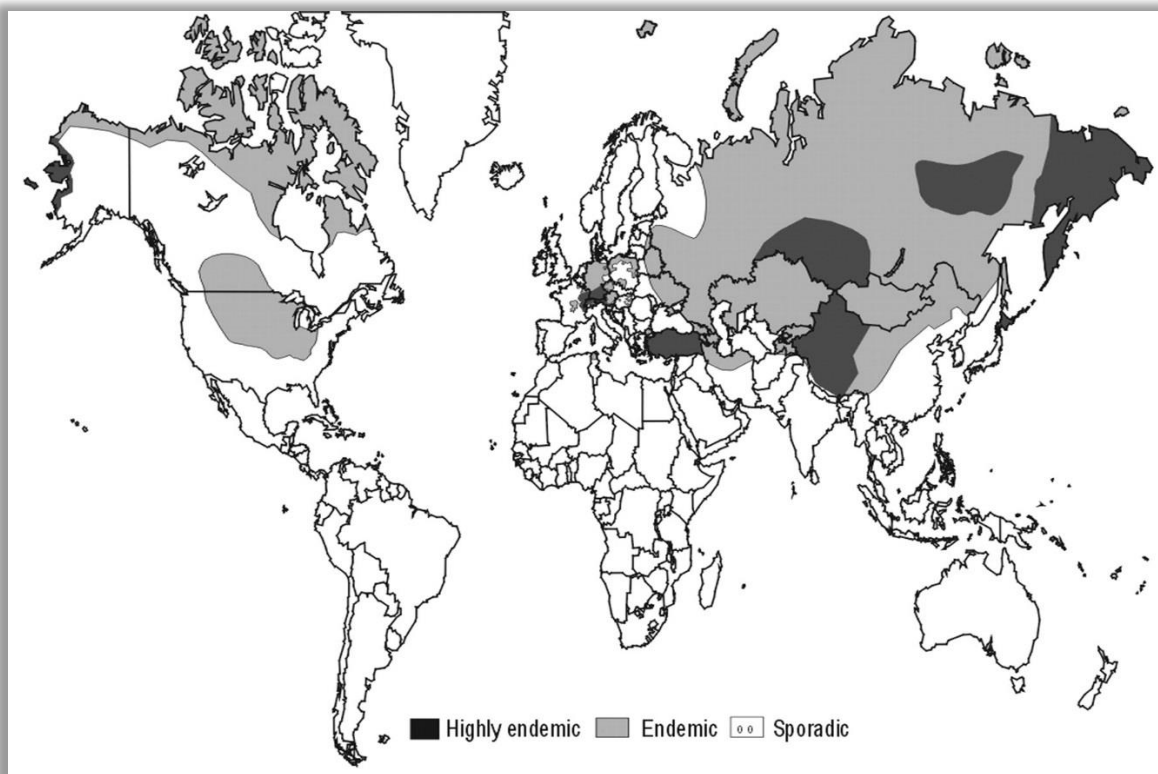
انتشار جغرافیایی اکینوкокوس گرانولوزوس و هیداتیدوز در جهان

اکینوкокوس گرانولوزوس دارای دو چرخه زندگی اهلی و وحشی بوده که چرخه اهلی در انتقال بیماری به انسان، نقش مهمتری داشته و نسبت به چرخه وحشی، برای سلامت انسان تهدید بزرگتری محسوب می شود. بیشترین میزان بروز هیداتیدوز در مناطقی مشاهده می شود که دامپروری سنتی رواج داشته و ارتباط بین انسان و دام بیشتر است (تصویر ۵). در سیکل اهلی، پتانسیل انتقال، بیشتر در کشورهایی دیده می شود که فقیر بوده و از سطح آموزش و سرویس های دامپزشکی مناسبی برخوردار نیستند. در این کشورها، میزان

آلودگی سگ ها از ۲۰ تا ۵۰ درصد و آلودگی گوسفندان از ۵۰ تا ۷۰ درصد گزارش شده است (۲۷، ۲۸). بیشترین شیوع انگل، در بخش هایی از اوراسیا (نظیر نواحی مدیترانه ای، چین، روسیه و کشورهای مستقل همجوار آن) شمال و شرق آفریقا، استرالیا و جنوب آمریکا مشاهده می شود (۲۸). در بیشتر جمهوری های شوروی سابق و شرق اروپا، بیماری افزایش قابل ملاحظه ای داشته (تا چهار برابر نسبت به دهه های گذشته) و سطح عفونت در کشورهای آسیای مرکزی نسبت به قبل (قبل از جدایی از شوروی سابق) افزایش نشان داده است، که این مسئله می تواند ناشی از تنگنا های ساختاری و اقتصادی و عدم وجود حمایت مالی دولتی باشد. افزایش سطح عفونت، باعث بازپدید بیماری هیداتیدوز در بعضی از کشورهای واقع در منطقه مذکور از جمله قزاقستان، ازبکستان، قرقیزستان، تاجیکستان و ترکمنستان شده است (۲۷، ۲۹، ۳۰).

در بعضی از کشورها از جمله چین، آمارها حاکی از افزایش هیداتیدوز می باشد، ولی ارتباط آن با افزایش شیوع مشکل بنظر می رسد و این افزایش، ممکن است به جهت بهبود روش های تشخیصی باشد (۳۰). اکینوکوکوزیس کیستیک از تمام کشورهای منطقه خاورمیانه و کشورهای عربی شمال آفریقا گزارش شده است. در این منطقه، بروز سالیانه از ۱ تا ۲۷ در ۱۰۰ هزار نفر گزارش شده است. همچنین برآورد می شود نزدیک به نیم میلیون نفر، فرد مبتلا در مناطق اندمیک مذکور زندگی می کنند (۲۹، ۳۱). تنوع زیادی از کمپلکس اکینوکوکوس گرانولوزوس از آفریقا گزارش شده و بیشترین میزان بروز، مربوط به مناطق شمال و شرق آن می باشد که پرورش گوسفند در آن رواج دارد (۳۰). در مناطق شمالی آفریقا از جمله کشورهای مصر، لیبی، تونس و مراکو و نواحی ساحلی Sabsaharan، از جمله کشورهای اتیوپی، کنیا، موریتانی، سودان و تانزانیا بیماری به صورت هیپراندمیک است (۳۲). همچنین در کشورهای منطقه غرب آسیا از جمله لبنان، سوریه، اردن، فلسطین اشغالی، ترکیه، عراق و ایران بیماری مذکور به صورت اندمیک وجود دارد (۳۱). در غرب، مرکز و جنوب اروپا نیز بیماری گزارش شده و از اهمیت بسزائی برخوردار است. تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۱ منتشر شده حاکی از آن است که در اسپانیا سالانه ۱۳ میلیون یورو بخاطر کیست هیداتید در

انسان و ۱۶ میلیون یورو برای تلفات حیوانی هزینه شده است. در سیسیل و ساردینیای ایتالیا شیوع آلودگی در گوسفندان به ترتیب ۶۷ و ۷۵ درصد و میزان بروز بیماری در انسان، ۲/۳ و ۶/۶ در صد هزار نفر در سال گزارش شده است. بعلاوه در شمال، مرکز و جنوب ایتالیا نقاط کانونی از اکینوкокوزیس مشاهده می شود. مطالعه ای که در یونان به وسیله سونوگرافی انجام شده کاهش شیوع بیماری را در انسان نشان می دهد. این کاهش ممکن است بخاطر اجرای برنامه های کنترلی ملی باشد. ولز منطقه آندمیک انگلستان است و شواهد موجود نشان می دهد که بیماری در این منطقه بازپدید است (۲۹). در ایالات متحده، بیشترین آلودگی در مهاجرینی دیده می شود که از کشورهای شدیداً اندمیک آمده اند. انتقال موارد تک گیر بیماری، از آلاسکا، کالیفرنیا، آریزونا و نیومکزیکو گزارش شده است. در آمریکای جنوبی، تمام ژنوتیپ های اکینوкокوس گرانولوزوس از اروپا یا دیگر نواحی، به طور تصادفی و با حیوانات اهلی وارد شده اند و وجود تنوع گونه ای و ژنوتایپی در این نیم قاره دور از انتظار نیست. در اروپا، در مناطق ایسلند و جنوب قبرس و در اقیانوسیه در مناطقی از تاسمانیا و نیوزلند، کنترل از موفقیت بالایی برخوردار بوده و شیوع تقریباً نزدیک به صفر است. در استرالیا اکینوкокوس گرانولوزوس تنها گونه از جنس اکینوкокوس است که طی مهاجرت اروپایی ها، با احشام و سگ به آن جا وارد شده و در حال حاضر انتقال در مناطق مذکور از طریق هر دو چرخه اهلی و وحشی صورت می گیرد (۲۱، ۲۷، ۲۹-۳۱).



تصویر ۵: توزیع جغرافیایی هیداتیدوز در جهان

انتشار جغرافیایی اکینوкокوس گرانولوزوس و هیداتیدوز در ایران

اکینوкокوس/ هیداتیدوزیس یکی از مهمترین بیماری های زئونوز شایع در ایران بوده و بر اساس گزارش های اخیر سازمان جهانی بهداشت (WHO)، ایران در رده مناطق اندمیک و هیپر اندمیک بیماری بویژه در مناطق روستایی شمال و غرب قرار گرفته است. آلودگی سگ های گله بر حسب منطقه، بین ۳/۳ تا ۶۳/۳٪ گزارش شده است (۳۱). متوسط آلودگی به کیست هیداتید در کشتارگاههای بزرگ ایران، در سال های ۸۶-۸۱، ۶/۷۳٪ گزارش شده که در طی این دوره، روند افزایشی نیز داشته است. در بین ۲۸ استان مورد بررسی، بیشترین میزان آلودگی به ترتیب از استان های خراسان (۱۸/۷٪)، سمنان (۱۳/۳٪)، آذربایجان شرقی (۱۲/۶۲٪)، مازندران (۱۱/۲۱٪)، کرمان (۲/۸۸٪)، قزوین (۲/۷۱٪)، کرمانشاه (۲/۴۱٪) و یزد (۲/۴٪)، گزارش شده است (۳۳).

(۳۴). در یک بررسی دیگر که در استان های شمالی انجام شده، میانگین شیوع هیداتیدوز در دام های کشتار شده طی سال های ۸۳ تا ۸۷، ۱۲/۸٪ گزارش شده است (۳۵).

موارد انسانی بیماری به طور منظم از قسمت های مختلف ایران گزارش شده است. براساس مطالعات انجام شده توسط رکنی و همکاران در بخش های جراحی بیمارستان های ایران، بطور میانگین از هر ۱۰۰ هزار نفر، یک نفر به کیست هیداتید مبتلا بودند (۳۶). که این میزان توسط توکلی و همکاران در سالهای ۸۱ الی ۸۶ بطور متوسط ۰/۶۱ در صد هزار گزارش گردید (۳۴). در مطالعه ای که بر روی موارد جراحی شده بیماران هیداتیدوزی در بیمارستانهای مختلف کشور انجام گردید، مشخص شد که از ۴۸۵۰ مورد قطعی هیداتیدوز، بیشترین میزان شیوع، متعلق به منطقه خراسان به میزان ۴/۴۵ در صد هزار نفر جمعیت بود که در همین مطالعه، میزان مرگ و میر ۱/۷۵٪ برآورد گردید (۳۷). همچنین نتایج یک مطالعه در سه بیمارستان عمومی شیراز، نشان می دهد که از تمام موارد جراحی شده در طی بیست سال، ۱۲۲۷ مورد با تشخیص قطعی کیست هیداتید همراه بوده است (۳۸). مقایسه آمار فوق الذکر با مطالعات سرواپیدمیولوژی نشان میدهد که میزان موارد مثبت سرولوژیک، بیشتر از موارد مثبت حاصل از جراحی می باشد، بطوریکه مطالعه بر روی جمعیت مناطق مختلف ایران نشان داده که ۳٪ جمعیت همدان و ۵/۵۵٪ جمعیت مناطق مختلف جنوب کشور، از نظر وجود آنتی بادی مثبت بوده اند (۳۹، ۴۰). در مطالعه ای دیگر که بر روی هزار نفر از عشایر جنوب کشور انجام شده، شیوع هیداتیدوز با استفاده از تست الایزا، ۵/۴٪ گزارش شده است. هرچند که این آلودگی با اولتراسونوگرافی، ۱/۲٪ گزارش شده است (۴۱).

بر اساس بیشتر گزارش های موجود در ایران، کبد و ریه مهمترین اعضا آلوده به انگل بوده و بقیه اندام ها از جمله قلب، مغز، طحال، عضلات، استخوان ها و ... از دیگر اندام های آلوده می باشند. از نظر سنی، بیشترین موارد گزارش شده بیماری در انسان، سنین ۲۰-۴۰ سالگی بوده و از نظر

جنسیت، بیماری در زنان بیشتر از مردان بوده است. از نظر شغلی نیز، زنان خانه دار به ویژه در روستاها، به دلیل تماس زیاد با سبزیجات آلوده، نظافت منزل و خاکخواری در دوران بارداری، بیشترین موارد گزارش شده را به خود اختصاص داده اند. تماس با سگ و خوردن سبزیجات آلوده از جمله ریسک فاکتورهای مهم بیماری محسوب می شوند. آلودگی سگ، گرگ و شغال به عنوان میزبان های اصلی از قسمت های مختلف ایران گزارش شده است. به نظر می رسد گوسفند با ۸۸ درصد و شتر با ۷۰ درصد کیست های بارور، مهمترین میزبان واسط در چرخه انتقال محسوب شده و گاو با ۱۹ درصد کیست های بارور، از نظر انتقال، اهمیت کمتری داشته باشد (۱۴، ۳۱).

بیماریزایی و علایم بالینی هیداتیدوز:

بیماری هیداتیدوز ممکن است به صورت اولیه و با خوردن مواد آلوده به تخم انگل و یا به صورت ثانویه و در اثر پاره شدن کیست ها و انتشار اجزای زنده و قابل تکثیر انگل ایجاد شود (۷). رشد بعضی کیست ها قابل توجه بوده ولی در برخی موارد کیست ها ممکن است سال ها بدون تغییر باقی بمانند و یا کلسیفیه شده و در بعضی مواقع خودبخود ناپدید شوند. علایم بالینی بیماری در انسان و حیوانات، به تعداد، اندازه و محل تشکیل کیست بستگی دارد. محل تشکیل کیست ها در ۶۵٪ موارد، کبد و در ۲۵ درصد موارد ریه می باشد و در ۱۰ درصد موارد، اندام های دیگر ممکن است مبتلا شوند. رشد آهسته کیست ها، اغلب به خوبی تحمل شده ولی به مرور زمان، بزرگ شدن کیست ها می تواند باعث اختلال عملکردی اعضا شود. علایم هیداتیدوز کبدی می تواند شامل بزرگی کبد، درد اپیگاستر راست، تهوع و استفراغ باشد. در صورت پاره شدن کیست ها و آزاد شدن ناگهانی محتویات آن، می تواند باعث ایجاد عوارض مهمی از جمله عفونت حساسیت و واکنش های آلرژیک ضعیف تا آنافیلاکسی کشنده شود. در ۲۵٪ بیمارانی که دچار پارگی کیست های کبدی می شوند، ممکن است به علت شوک آنافیلاکتیک، مرگ ناگهانی رخ دهد. گاهی ممکن است کیست های کبدی به داخل مجاری صفراوی، کولون ها، و یا حفره شکم باز شوند. غشاء کیست های پاره شده در ریه، ممکن است از طریق برونش

ها خارج شده و یا بعنوان کانون عفونت برای آلودگی های قارچی و باکتریایی ایفای نقش کنند (۴۲). کیست هایی که در اندام های حیاتی از جمله مغز و قلب ایجاد می شوند، می توانند عوارض خطرناکی ایجاد نمایند. کیست هایی که در سیستم اعصاب مرکزی تشکیل می شوند ممکن است علائمی شبیه اسپارگانوزیس چشمی ایجاد نمایند. کیست های استخوانی بعلت عدم تشکیل غشای محصور کننده، رشد سرطانی داشته و می توانند باعث شکستگی آنها شوند (۲۰).

روش های تشخیصی هیداتیدوز:

تشخیص کلینیکی:

مشاهده علائم کلینیکی بیماری، همراه با شرح حال بیمار، از جمله محل زندگی، شغل و سابقه نگهداری از سگ، می تواند مطرح کننده بیماری باشد (۴۳).

تشخیص رادیولوژیک : روش های تصویربرداری از جمله رادیوگرافی، سونوگرافی، اولتراسونوگرافی، آنژیوگرافی، میلوگرافی، سی تی اسکن، و ¹MRI از روش های مهم در تشخیص بیماری می باشند. در ۹۹٪ موارد، با عکس ساده قفسه سینه، کیست های ریوی تشخیص داده می شوند. اولترا سونوگرافی برای توصیف ساختمان کیست مفید بوده و ویژگی آن در بیماریهای کلیوی و ریوی حدود ۹۰٪ است (۴۴، ۴۵). کیست های مغزی، سیستم اعصاب مرکزی و قلبی با استفاده از روش MRI تشخیص داده می شوند. سی تی اسکن علاوه بر اینکه در تشخیص کیست های استخوانی کاربرد دارد، در تشخیص کیستهای کوچک (کوچکتر از ۱ سانتی متر) و جستجوی کیست های دختر و کلسیفیه شده کمک کننده هستند. همچنین با CT اسکن، می توان از آلودگی بافت کبد و مجاری صفراوی به کیست، اطلاعاتی بدست آورد. کیست های هیداتید را بر اساس ویژگی های بدست آمده از سونوگرافی و اولترا سونوگرافی به کلاس های مختلفی تقسیم می کنند که این مسئله می

¹⁻ Magnetic resonance imaging

تواند در انتخاب روشهای درمانی مفید باشد. آنژیوگرافی و میلوگرافی در مورد بیمارانی که ممنوعیت استفاده از MRI دارند می تواند مورد استفاده قرار گیرد (۴۶).

تشخیص ایمونولوژیک

روش های تشخیصی ایمونولوژیکی نه تنها در تشخیص اولیه بلکه در پیگیری درمان بیماران و مطالعات اپیدمیولوژیکی نیز قابل استفاده می باشند. یافتن آنتی ژن های در گردش، حساسیت کمتری نسبت به اندازه گیری آنتی بادی دارد. روش های هماگلوتیناسیون غیرمستقیم^۱، ایمونوبلات^۲، مخصوصا^۳ ELISA رایجترین تست های ایمونولوژیکی مورد استفاده هستند (۴۷). از دیگر روش های تشخیصی ایمونولوژیکی که کمتر مورد استفاده قرار می گیرند، می توان به دابل ایمونودیفیوژن^۴ در ژل، ایمونوالکتروفورز^۵ و کانتر ایمونوالکتروفورز^۶ اشاره کرد (۴۸-۵۰). در سال های اخیر چندین زیرواحد از زیرواحدهای IgG، برای تشخیص هیداتیدوز در آزمایشگاههای تشخیصی مورد استفاده قرار گرفته که زیرواحد IgG4 حساستر از بقیه زیرواحدها ارزیابی شده است و برای تائید بیماری در افرادی که پاسخ IgG توتال منفی داشته اند، سودمند می باشد.

IgE ایمونوگلوبولین دیگری است که در ارزیابی روند بیماری می تواند مورد استفاده قرار گیرد (۴۲). استاندارد طلایی تشخیص کیست هیداتید انسانی بر اساس جستجوی آنتی بادی IgG بر علیه آنتی ژن B مایع کیست هیداتید می باشد که به روش الایزا یا سایر روش های ایمونولوژیک قابل شناسایی است (۱۹، ۴۵، ۵۱).

تشخیص افتراقی:

¹ - Indirect hemagglutination assay

² - Immunoblotting

³ - Enzyme-linked immunosorbent assay

⁴ - Gel double diffiusion test in plates

⁵ - Immunoelectrophoresis

⁶ - Counter immunoelectrophoresis

کیست هیداتید را باید از بیماری هایی نظیر آبسه آمیبی ، تومورهای بدخیم و دیگر تومورهای شکمی افتراق داد. همچنین کیست های ریوی باید از سل، تومورهای بدخیم و آکتینومایکوز^۱ افتراق داده شوند. کیست های استخوانی هم باید از سل استخوانی، استئومیلیت^۲ و سارکوم^۳ و کیست های مغزی هم بایستی از انواع تومورهای مغز و سیتی سرکوس سلولوزه^۴ افتراق داده شوند (۴۳).

کنترل و پیشگیری هیداتیدوز:

برای کاهش موارد بیماری هیداتیدوز و مبارزه با گسترش آن، روش های مختلفی می توانند دخیل باشند که عبارتند از:

- رعایت موازین بهداشتی از جمله جلوگیری از تغذیه سگ ها با احشاء آلوده به کیست میزبان های واسط.
- کاهش تماس انسان با سگ.
- از بین بردن سگ های ولگرد
- سوزاندن یا دفن لاشه یا احشاء آلوده به کیست هیداتید حیوانات (تا از دسترس سگ ها دور باشند).
- محصور کردن مزارع و جلوگیری از ورود سگ ها به مناطق مذکور
- تهیه شناسنامه بهداشتی برای سگ های گله و صاحبدار
- درمان سگ های گله و صاحبدار (هر ۶ هفته یکبار با پرازیکوانتل)
- احداث کشتارگاههای بهداشتی، کاهش سن کشتار گوسفندان و جلوگیری از کشتار غیرمجاز دام.
- آموزش عمومی در مورد نحوه انتقال انگل و رعایت نکات بهداشتی (۴۳).

¹ - Actinomycosis

² - Osteomyelitis

³ - Sarcoma

⁴ - Cysticercus cellulosae

در ایسلند، نیوزلند، جنوب قبرس و تاسمانیا به دلیل وجود برنامه های کنترلی با استانداردهای بالای بهداشتی، موارد بیماری در سال های اخیر نزدیک به صفر شده است (۲۷، ۲۹).

درمان هیداتیدوز:

روش های درمانی بیماری هیداتیدوز در حال حاضر به شرح ذیل می باشد :

- درمان دارویی

- درمان جراحی

- استفاده از روش درمانی PAIR^۱

- ریشه کنی ضایعات با استفاده از حرارت حاصله از امواج رادیویی (Radiofrequency thermal ablation)

درمان دارویی:

داروهای مورد استفاده، آلبندازول و مبندازول بوده که آلبندازول، به علت متابولیزه شدن سریع، داروی انتخابی می باشد. این داروها به علت حلالیت کم در آب، کمتر در روده جذب شده و در نتیجه برای بیمار خطر کمتری دارند (یکی از مهمترین مزیت های استفاده از داروهای مذکور). فعالیت ضد کرمی آلبندازول ناشی از متابولیت آلبندازول سولفوکساید است که متابولیت اصلی آن محسوب می شود. این متابولیت قادر است از دیواره کیست عبور کرده و بر روی اجزای زایای انگل اثر کرده و آنها را از بین ببرد. آلبندازول و متابولیت آن، دارای نیمه عمر ۸/۵ ساعت می باشند. آلبندازول به صورت خوراکی، هر ۱۲ ساعت یک بار به مقدار ۱۵-۱۰ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن در روز تجویز می شود و مدت استفاده از آن طولانی است. مصرف این داروها به همراه جراحی باعث کاهش فشار شده ، احتمال ایجاد کیست ثانویه را کم می کند (۱۹).

درمان جراحی:

^۱- Puncture , Aspiration, Injection, Reaspiration

اگرچه پیشرفت های زیادی در درمان دارویی بیماری هیداتیدوز حاصل شده ولی روش جراحی همچنان مهمترین روش درمانی بیماری مذکور می باشد. این مساله در مورد کیست های بزرگ، کیست های سطحی که احتمال پاره شدن دارند، کیست های عفونی و کیست هایی که در موقعیت آناتومیک حیاتی قرار گرفته و فشار زیادی به اعضا مجاور وارد می کنند، بیشتر صادق است. یکی از چالش های جراحان در جراحی کیست هیداتید، احتمال نشت پروتواسکولکس های زنده از محل عمل می باشد که این موضوع اهمیت و پیچیدگی جراحی کیست هیداتید را دو چندان می کند. لذا جراحان برای جلوگیری از عود و یا کاهش بروز آن، قبل از عمل جراحی، مواد پروتواسکولکس کش از جمله اتانول ۹۵٪، فرمالین ۲٪، سرم نمکی هیپر تونیک، نیترات نقره و بتادین تزریق می کنند که البته هر کدام از این مواد می توانند دارای معایبی باشند که کاربرد آنها را محدود می کند (۵۲).

روش درمانی PAIR:

در این روش، ابتدا محل کیست را با کمک اولتراسونوگرافی مشخص نموده و پس از آسپیره کردن مایع داخل کیست، ترکیبات پروتواسکولیسیدال را به داخل آن تزریق کرده، و بعد از ۱۵-۲۰ دقیقه مجدداً ترکیبات داخل کیست را آسپیره می کنند. با توجه به اینکه روش PAIR دارای کمترین تهاجم، درد و عوارض جانبی برای بیمار است و با انجام این روش درمانی، بیمار می تواند زودتر ترخیص شده و فعالیت های خود را از سر بگیرد، به نظر می رسد یکی از مناسب ترین روش های درمانی هیداتیدوز باشد (۵۲). PAIR (بجز در ابتدای بارداری) باید با درمان شیمیایی همراه شود (۵۳، ۵۴).

ریشه کنی ضایعات با استفاده از حرارت حاصله از امواج رادیویی (Radiofrequency thermal ablation):

در این روش با استفاده از امواج رادیویی، ضایعات پوستی، خال ها و بعضی از تومورهای کبدی را با حرارت، سوزانده واز گسترش آنها جلوگیری می کنند. این روش، نوعی درمان سرپایی ضایعات مذکور محسوب می شود. مطالعات در زمینه استفاده از این روش در درمان کیست هیداتید، نشان داده است که این روش، برای تخریب لایه زایا روش مطمئنی می باشد (۵۲).

پاسخ های ایمنی در برابر کیست هیداتید:

آنتی ژن های اکینوкокوس:

از سال ۱۹۶۰ تا کنون تحقیقات زیادی روی پروتئین های کیست هیداتید صورت گرفته است. از اهداف مهم شناسایی پروتئین های مذکور، تشخیص خواص آنتی ژنیکی وایمونوژنیک آنها می باشد که این مساله می تواند در تولید واکسن وهمچنین استفاده از آن در روش های تشخیصی ایمونولوژیکی مفید باشد. آنتی ژن های انگل اکینوкокوس در مراحل مختلف رشد، به اشکال مختلفی بیان شده و انسان در مراحل مختلف، به آنتی ژن های مذکور، واکنش های ایمونولوژیکی متفاوت نشان می دهد (۵۵، ۵۶). مطالعات گذشته حاکی از آن است که انکوسفر می تواند باعث برانگیختن پاسخ ایمنی شدیدی علیه انگل شود. همچنین لایه کوتیکولی که یک لایه کیتینی و بدون سلول است، عنصر اصلی رابط بین انگل ومیزبان در مرحله لاروی محسوب شده و پاسخ های ایمونولوژیک در برابر این لایه، بصورت تولید آنتی بادی های فراوان و مستقل از T.cell می باشد. لایه زایا ی کیست، به عنوان سدی در برابر ایمنی میزبان عمل می کند، چنانکه آسیب این لایه در اثر پارگی، دست کاری یا ضربه می تواند باعث تحریک آنتی ژنی بیشتر شود. وقتی که این تحریک آنتی ژنی صورت می گیرد، سطح آنتی بادی ها تا مدت نا محدودی می تواند به صورت مستمر افزایش یابد (۵۷).

مطالعات گسترده ای بر روی آنتی ژن های مایع کیست هیداتید، که نقش مهمی در روش های تشخیصی دارند، صورت گرفته است. مهمترین آنتی ژن های موجود در مایع کیست هیداتید، آنتی ژن Arc 5 و آنتی ژن

B می باشند (۵۸). آنتی ژن Arc 5 یک آنتی ژن ۴۰۰ کیلودالتونی از جنس گلیکوپروتئین حساس به حرارت بوده که نقش بیولوژیک آن به طور کامل شناخته نشده است. آنتی ژن مذکور می تواند در تشخیص سرولوژیکی کیست هیداتید انسانی مورد استفاده قرار گیرد. آنتی ژن B، یک لیپوپروتئین مقاوم به حرارت با وزن ۱۶۰ کیلو دالتونی است که دارای سه زیر واحد با خواص الکتروفوریتیک متفاوت بوده که زیر واحد ۸/۱۲ کیلودالتونی آن می تواند باعث القاء پاسخ ایمنی سلولار و همورال قابل توجه شود. وجود زیر واحدهای متفاوت آنتی ژن B و تغییر آنها از یک ایزوفرم به ایزوفرم دیگر می تواند از مکانیسم های انگل در فرار آن از سیستم ایمنی میزبان و بر هم زدن واکنش های التهابی اولیه باشد (۵۹-۶۲).

ایمنی ذاتی:

اساس ایمنی ذاتی در مقابل انگل ها، فاگوسیتوز می باشد، اما کرم ها و مراحل لاروی آن ها، در مقابل کشته شدن فاگوسیتی مقاوم هستند. در مجموع، سیستم ایمنی در مقابل عفونت های انگلی بویژه عفونت های کرمی چندان موفق نیست و بیشتر انگل ها قادرند در بدن میزبان خود زنده مانده و ایجاد یک عفونت مزمن و طولانی مدت نمایند. البته سلول های فاگوسیت می توانند به کرم ها حمله کرده و مواد میکروب کش را به منظور کشتن ارگانیزم های کرمی، روی آن ها ترشح کنند. ایمنی ذاتی انسان بر علیه کیست هیداتید و لایه های آن بالاخص لایه های ژرمینال به عنوان یکی از مکانیسم های احتمالی در سرکوب کیست هیداتید محسوب می شود. اجزای مهم سلولی ایمنی ذاتی، نوتروفیل ها، ماکروفاژها، ائوزینوفیل ها، فیبروبلاست ها و جزء پنجم مسیر آلترناتیو کمپلمان می باشد. سیستم کمپلمان می تواند با دخالت آنتی بادی ها، نقش خود را در ایمنی بر ضد انگل ایفا نماید. البته پروتواسکولکس های اکینوкокوس گرانولوزوس می توانند بدون حضور آنتی بادی هم سیستم کمپلمان را فعال نمایند. مایع خام کیست هیداتید، خاصیت مهارکنندگی کمپلمان را داشته و شاید به همین دلیل است که علیرغم وجود کمپلمان در مایع کیست هیداتید، پروتواسکولکس ها سالم باقی می مانند.

همچنین در مایع کیست هیداتید فاکتورهای فعال کننده جزء C3 کمپلمان وجود دارد که در مواقع نشت مایع کیست در سرم، می تواند باعث ایجاد ترکیبات آنافیلاتوکسین و در نتیجه بروز شوک آنافیلاکسی شود (۶۳).

ایمنی همورال:

پاسخ اولیه به آنتی ژن های مایع کیست هیداتید و آنتی ژن های انکوسفر پس از ۲ تا ۱۱ هفته، در میزبان های آلوده به تخم یا انکوسفر اکینوкокوس ایجاد می شود. این آنتی بادی ها اغلب IgG بوده و نقش اساسی، در از بین بردن پارازیت داشته و هسته مرکزی در پاسخ ایمنی حفاظتی علیه اکینوкокوس کیستیک را تشکیل می دهند. در فاز مزمن بیماری، افزایش میزان آنتی بادی به خصوص آنتی بادی های IgG، IgM و IgE در میزبان اتفاق می افتد که بیشتر این پاسخ ها بصورت IgG₁ و IgG₄ می باشد (۴۷، ۶۳).

ایمنی سلولار:

در طی مراحل اولیه عفونت با اکینوкокوس، فعالیت قابل ملاحظه ای از ایمنی سلولی بصورت پاسخ های التهابی سلولی و تغییرات پاتولوژیکی ایجاد می شود و ارتشاح سلولهای ائوزینوفیل، نوتروفیل، ماکروفاژ و فیبروبلاست ها در میزبان مشاهده می شود. این واکنش ها اگرچه منجر به پاسخ های التهابی جدی نمی شوند ولی کیست ها تمایل به احاطه شدن توسط لایه فیبروزی را داشته و باعث جدا شدن لایه کوتیکولی از بافت میزبان می گردد. انگل، سیستم ایمنی میزبان را دستخوش تغییر قرار داده و پروتئین های مترشح و همچنین پروتئین های سطحی انگل در طیف گسترده ای از عملکردهای ایمنی میزبان شرکت می کنند. مایع هیداتید کمپلکسی از آنتی ژن ها با ویژگی های متفاوت می باشد اما آنتی ژن های Arc 5 و B نقش مهمتری در پاسخ های ایمنی دارند (۴۷، ۵۳، ۶۳-۶۶).

آنتی ژن Arc 5 و آنتی ژن B، آنتی ژن های اصلی ایمونوژن بوده و مسئول فعالیت هایی هستند که در بقاء انگل در پستانداران نقش اساسی دارند. غلظت آنتی ژن B حدوداً ۱۰ برابر بیشتر از آنتی ژن Arc 5 می

باشد. آنتی ژن B در ایمنی طبیعی اولیه، مهار لانه گزینی نوتروفیل ها و فعالیت سلول های Th و در نتیجه پاسخهای غیرحفاظتی سلول های Th₂ دخالت دارد. مطالعات نشان داده است که فعالیت Th₁ مرتبط با ایمنی محافظتی است در حالیکه Th₂ بعثت افزایش IL10 با حساسیت در برابر بیماری و فرار انگل از سیستم ایمنی مرتبط است (۴۵). پیشرفت های اخیر در درک واکنش های ایمونولوژیکی عفونت های کرمی، نشانگر آن بوده اند که پاسخ های Th₂ نقش اساسی در عفونت های مزمن ایفا می کنند (۵۲). با این حال یکی از ویژگی های قابل توجه عفونت کیست هیداتید مزمن، همراهی IFN γ ، IL4 و IL10 در مقادیر بالا می باشد (۵۳). مشخص نیست که چرا عفونت کیست هیداتید می تواند سطح بالایی از سایتوکاین های مرتبط با Th₁ و Th₂ را ایجاد نماید، در حالیکه این دو عمدتاً باعث تنظیم منفی یکدیگر می شوند (۵۴). نوع آنتی ژن و میزان آن ممکن است نقش کلیدی در این امر داشته باشد. به عنوان مثال آنتی ژن B مایع کیست هیداتید، باعث انحراف نسبت سایتوکاین های Th₁ و Th₂ به سمت Th₂ به خصوص در وضعیت فعال و پیشرونده بیماری می شود. نقش IL10 در عفونت مزمن تا حد زیادی ناشناخته است، اگر چه گزارشات جدید نشان داده که IL10 ممکن است پاسخ های محافظتی وابسته به Th₁ را مختل کرده و باعث زنده ماندن انگل در بدن میزبان شود (۶۳).

آپوپتوزیس و مکانیسم های آن در هیداتیدوز:

از مسیرهای جدید ایمنی ذاتی و ناشناخته میزبان علیه کیست هیداتیک، اینفلامزوم، تول لایک رسپتورها و آپوپتوزیس می باشد (۹، ۱۰). اخیراً آپوپتوزیس به عنوان بخش مهمی از ایمنی ذاتی میزبان در سرکوب انگل به اثبات رسیده است (۱۱). آپوپتوزیس یک مرگ برنامه ریزی شده است که توسط یکسری مکانیسم های بیوشیمیایی و مرفولوژیکی از قبیل فشردن کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA، تولید اجسام آپوپتوتیکی و بیان مولکول های آپوپتوتیک داخل و خارج سلولی انجام می پذیرد (۶۷-۶۹). آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می شود و برای

تکامل و هموستاز ضروری است. بعضی از داروها از جمله داروهای شیمی درمانی باعث القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی می شوند (۷۰، ۷۱).

مسیرهای آپوپتوزیس :

۱- مسیر خارجی یا آپوپتوز القاء شده توسط گیرنده های مرگ:

در غشاء پلاسمایی اغلب سلول ها، گیرنده های مرگ وجود دارد. زمانی که این گیرنده ها توسط لیگاندهای مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القاء آپوپتوز می گردند. کاسپاز ها آنزیم هایی هستند که در آپوپتوز نقش اساسی دارند (۷۲).

۲- مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس:

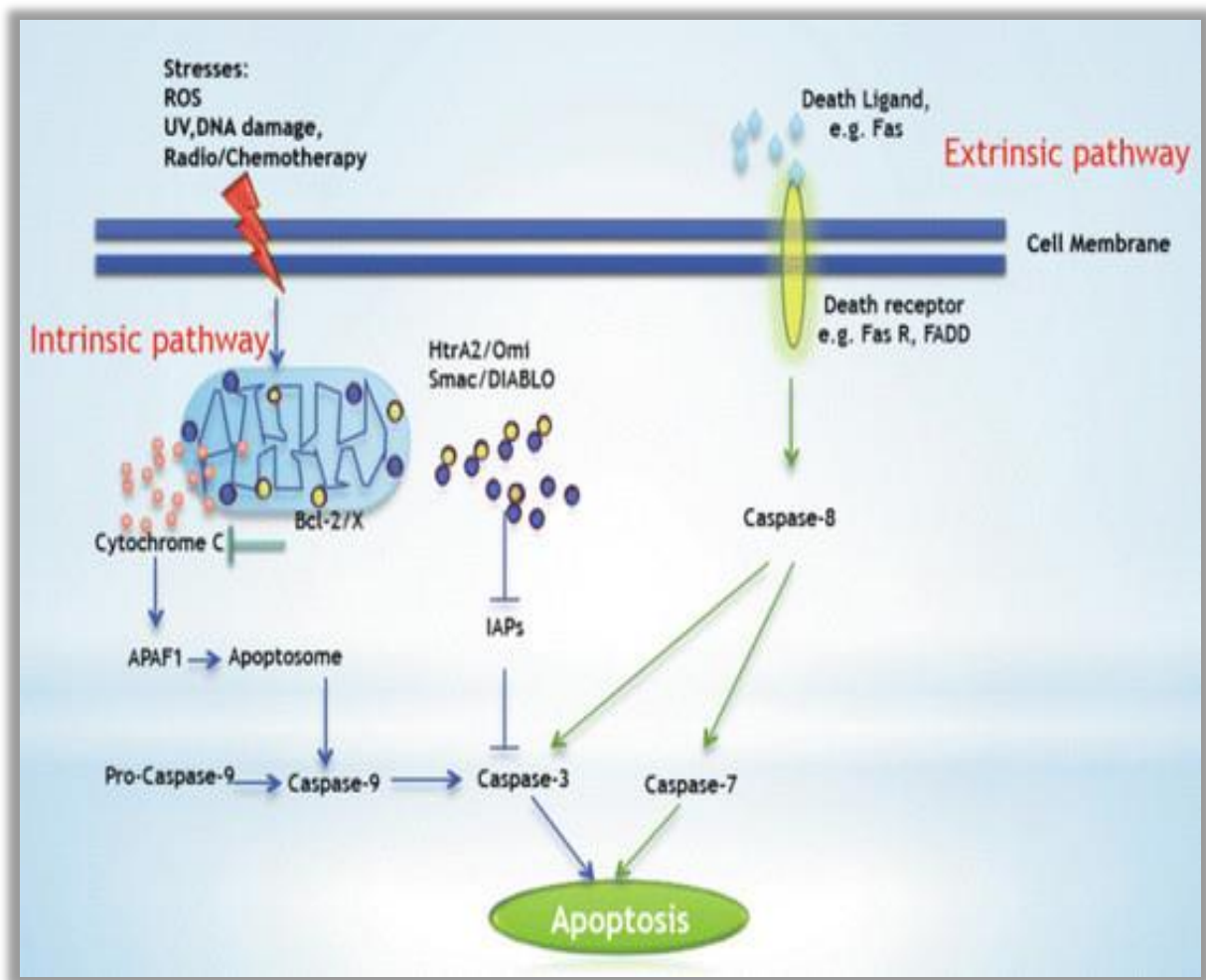
در پاسخ به سیگنال های مرگ سلولی، نفوذپذیری غشاء خارجی میتوکندری سبب آزاد شدن مولکول های پرو آپوپتوتیک از قبیل فاکتور القاء کننده آپوپتوز (AIF^1)، سیتوکروم C، $Smac^2/DIBLO^3$ و اندونوکلئاز G از فضای بین دو غشاء میتوکندری به داخل سیتوپلاسم می شوند. $Smac/DIBLO$ اثر آنتاگونیستی روی مهارکنندهای کاسپاز دارد. سیتوکروم C هم طی مکانیسمی که کاملاً مشخص نیست باعث الیگومر شدن $Apaf-1^4$ می شود و $Apaf-1$ کاسپاز ۹ را فعال می کند و کاسپاز ۹ فعال، سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی از قبیل کاسپاز ۳ و ۷ می شود (۷۳، ۷۴).

¹- Apoptosis Inducing Factor

²- second mitochondria-derived activator of caspases

³- Is a mitochondrial protein

⁴- Apoptotic protease activating factor 1



تصویر ۶: مسیر های فعال شدن آپوپتوزیس و کاسپاز های دخیل در این مسیر ها

کاسپازها:

کاسپازها جزء خانواده سیستمین پروتئازها هستند که نقش محوری در شروع و اجرای آپوپتوزیس ایفا می کنند. به دنبال فعال شدن کاسپازها، این آنزیم ها روی سوبستراهای خاصی عمل کرده، تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک مختلفی (از جمله چروک شدن سلول، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن DNA) در سلول ایجاد می نمایند. بنابراین ارزیابی فعالیت کاسپازها به عنوان یک مارکر تشخیصی آپوپتوزیس مطرح می باشد. کاسپازها را بر اساس ساختار مولکولی و ویژگی آنها نسبت به سوبسترای مربوطه و همچنین فعالیت فیزیولوژیک و اندازه پرودومین آن تقسیم بندی می نمایند. اما چیزی که در آپوپتوزیس اهمیت دارد، تقسیم بندی کاسپازها به دو گروه کاسپازهای آغازگر (۸ ، ۹ ، ۱۰ و ۱۲) با پرودومین طویل و کاسپازهای اجرایی (کاسپاز ۳ ، ۶ و ۷) با پرودومین کوتاه می باشد (۷۴، ۷۵). فعال شدن کاسپازها به میزان زیادی مختص آپوپتوزیس بوده و تعیین فعالیت آنها می تواند برای تمایز بین نکروز و آپوپتوزیس مورد استفاده قرار گیرد (۷۶، ۷۷).

یکی از مسیرهای جدید ایمنی ذاتی و کمتر شناخته شده میزبان علیه کیست هیداتیک، آپوپتوزیس می باشد و اخیراً آپوپتوزیس به عنوان بخش مهمی از ایمنی ذاتی میزبان در سرکوب انگل به اثبات رسیده است (۹، ۱۱).

بیان مساله :

هیداتیدوز یا اکینوкокوزیس یک بیماری مشترک بین انسان و دام بوده و توسط فرم لاروی اکینوкокوس گرانولوزوس ایجاد می شود. این بیماری از نظر بهداشتی و اقتصادی حائز اهمیت بوده و می تواند به عنوان یک تهدید برای سلامتی باشد (۳، ۳۱). اکینوкокوزیس در بسیاری از نقاط دنیا پراکندگی داشته و در کشورمان ایران بومی است. میزبانهای اصلی این انگل سگ سانان و میزبانهای واسط آن علفخواران می باشند. این بیماری در انسان، توسط جایگزینی فرم لاروی انگل در اندامهای مختلف از جمله کبد، ریه، مغز ایجاد می شود (۳، ۷، ۳۱، ۳۶، ۷۸). با توجه به اینکه عمل جراحی موثرترین روش درمانی هیداتیدوز می باشد، لذا انتخاب مواد پروتواسکولیسیدال موثر و کم ضرر قبل از عمل جراحی و تزریق آنها به داخل کیست ها خطر نشت پروتواسکولکس های زنده را کاهش داده و برای بسیاری از جراحان از اهمیت فراوانی برخوردار است (۷، ۳۶، ۷۹). در حال حاضر استفاده از مواد پروتواسکولیسیدال شیمیایی به جهت عوارض جانبی آنها محدود شده (۶، ۳۶، ۸۰) و استفاده از گیاهان دارویی به عنوان جایگزین مواد شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است چنانکه بعضی از آنها به عنوان مواد پروتواسکولیسیدال گزارش شده اند ولی جهت اطمینان از بی ضرر بودن آنها، تحقیقات بیشتر توسط محققین توصیه شده است (۸، ۸۰-۸۳). ایمنی ذاتی انسان بر علیه کیست هیداتیک و لایه های آن بالاخص لایه ژرمینال، به عنوان یکی از مکانیسم های احتمالی در سرکوب کیست هیداتیک محسوب می شود (۸۴). از مسیرهای جدید ایمنی ذاتی و ناشناخته میزبان علیه کیست هیداتیک، اینفلامزوم، تول لایک رسپتورها و آپوپتوزیس می باشد (۹، ۱۰). به طوری که اخیراً آپوپتوزیس به عنوان بخش مهمی از ایمنی ذاتی میزبان در سرکوب انگل به اثبات رسیده است (۱۱). و این روش می تواند یکی از بهترین روشها در از بین بردن انگل اکینوкокوس گرانولوزوس باشد (۱۲). آپوپتوزیس در طول تکامل نرمال موجودات، در بسیاری از پستانداران اتفاق می افتد. مرگ سلولی در دوران رشد و نمو جنینی و تشکیل موفقیت آمیز ارگانها، یک امر اساسی است (۸۵). همچنین مسیر آپوپتوزیس در موجودات، یک ابزار مفید برای از بین بردن سلولهای آسیب

دیده و عفونی می باشد (۸۶، ۸۷). آپتوزیس در بسیاری از بی مهرگان از جمله نماتودها، ترماتودها، بندپایان و سستودها از جمله کیست هیداتیک گزارش شده است (۱۲، ۸۴، ۸۸، ۸۹). با توجه به اینکه اثرات اسکولیسیدال عصاره گیاه دارویی کاکوتی (*Ziziphora tenuior*) در مطالعات قبلی شناسایی شده ولی مکانیسم اثر داروی مذکور که می تواند در سرنوشت بیمار موثر باشد هنوز مشخص نشده است (۱۳)، لذا در تحقیق حاضر احتمال القاء آپتوزیس و افزایش فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ توسط عصاره گیاه دارویی کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک مورد بررسی قرار گرفت.

فصل دوم

مروری بر متون

گیاه کاکوتی (*Ziziphora tenuior*)

این گیاه به تیره *Lamiaceae* (نعناعیان)، راسته *lamiales* و زیر رده *Asteridae* تعلق دارد. گیاه مذکور دارای جنس های مختلفی می باشد که مهمترین آنها عبارتند از : کاکوتی^۱، آویشن^۲، اسطوخودوس^۳، مرزنجوش^۴ و مریم گلی^۵. کاکوتی گیاهی است علفی، معمولا چند ساله با ساقه کوتاه به ارتفاع ۵ تا ۱۵ سانتی متر، برگ های آن باریک، نوک تیز با میان گره های کوتاه می باشند (تصویر ۷) همچنین گیاه مذکور دارای گل های کوچک به رنگ بنفش کمرنگ یا بنفش مایل به ارغوانی می باشد (تصویر ۸) . این گیاه نزدیک به ۳۰ گونه دارد که فقط ۴ گونه از آن در ایران شناسایی شده است. گونه های شناخته شده در ایران عبارتند از: *Z. clinopodioides* و *Z. persica*، *Z. tenuior*، *Z. capitata*. گیاه مذکور در کشور های ایران، افغانستان، پاکستان، روسیه، ترکمنستان، مناطق ماورای قفقاز، سبیری و عراق به صورت پراکنده رشد می کند. در ایران در مناطق کوهستانی شمال، مرکز، شمال غرب، جنوب و شمال شرق کشور به صورت خودرو وجود دارد (۹۰). مهمترین ترکیبات شیمیایی گیاه دارویی کاکوتی، شامل ترین ها، سزکویی ترین ها و مشتقات اکسیژنه آنها و بعضی از ترکیبات دیگر از جمله پولگون^۶، آلفاتریپینیل استات^۷، تیمول^۸،

¹ - Ziziphora

² - Thymus

³ - Mentha

⁴ - Origanum

⁵ - Salvia

⁶ - Pulegone

⁷ - Alpha-terpinyl acetate

⁸ - Thymol

کارواکرول^۱، منتون^۲، پیپریتون^۳، گرانیول^۴ و منتول^۵ می باشند. مطالعات مختلفی بر روی ترکیبات شیمیایی گیاه کاکوتی انجام شده و علی رغم وجود شباهت در نوع مواد تشکیل دهنده، مقادیر آنها با توجه به شرایط آب و هوایی، گونه گیاه و نوع خاک محل رویش متفاوت می باشد. ترکیبات فوق کم و بیش در گیاهان خانواده نعنائیان نیز وجود داشته و در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماریها از جمله دیسانتری، عفونت های رحمی و بیماری های تب دار کاربرد داشته و بعنوان خلط آور، ضد نفخ و تقویت کننده معده و دستگاه گوارش، استفاده می شود (۹۳-۹۰). همچنین اثرات مختلف ضد باکتریایی (۹۴، ۹۵)، ضد قارچی (۹۸-۹۶)، ضد لاروی (۹۹)، آنتی اکسیدانی (۱۰۰) و ضد انگلی از جمله اسکولیسیدالی عصاره گیاه کاکوتی توسط محققین مختلف گزارش شده است (۳۰، ۱۰۱).

بررسی های مختلفی در مورد القاء آپوپتوزیس توسط مواد مختلف و گیاهان دارویی از جمله گیاه کاکوتی، گیاهان هم خانواده آن و ترکیبات مختلف آنها بر روی سلول ها و میکروارگانیسم ها ی مختلف از جمله پروتواسکولکس ها انجام شده است، چنانکه Chachoyan و همکاران در سال ۱۹۹۶ اثرات ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی و ایمونومدولاتوری اسانس گیاه کاکوتی را بر روی سلول های سرطانی جدا شده از لنفوم غیر هوچکینی و همچنین غدد لنفاوی بیماری مذکور، بررسی کردند و نتیجه گرفتند که اسانس گیاه کاکوتی، رشد سلولهای بدخیم را تا ۳۲/۶٪ و غدد سرطانی را تا ۴۷/۵٪ کاهش داد که این اثر با غلظت اسانس کاکوتی و مدت زمان اثرآن، ارتباط مستقیم داشت. این محققین با استناد به تغییرات ساختاری در سلول های مورد مطالعه، اثرات مذکور را احتمالاً ناشی از القاء آپوپتوزیس در سلول های سرطانی عنوان نمودند (۱۰۲).

در سال ۲۰۱۲ امیری و همکاران، اثر آپوپتوتیک و سیتوتوکسیک اسانس و عصاره گیاه اسطوخودوس (یکی از گیاهان هم خانواده کاکوتی) را روی سلول های سرطانی سرویکس رحم بررسی نمودند. در این تحقیق مشاهده

¹- Carvacrol

²- Menthone

³- Piperitone

⁴- Geraniol

⁵- Menthol

شد که رشد سلول های سرطانی، توسط گیاه مذکور مهار شد و همچنین تجمع DNA در فاز G1 چرخه سلولی، از شواهد آپوپتوز سلول های سرطانی عنوان گردید. در مطالعه مذکور اثر آپوپتوتیک و سیتوتوکسیک اسانس و عصاره گیاه اسطوخودوس را به وجود ترکیباتی مثل تیمول و پولگون نسبت دادند (۱۰۳).

دلیلان و همکاران اثر ضد سرطانی عصاره گیاه اسطوخودوس (یکی از گیاهان هم خانواده کاکوتی) بر روی سلول های لنفوسیت جدا شده از بیماران لنفوم هوچکین را مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که گیاه مذکور با LC50 ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، باعث کاهش ویابیلیتی لنفوسیت ها شده و همچنین تکثیر این سلول ها را مهار نمود و همچنین عنوان کردند که آپوپتوزیس می تواند یک مکانیسم مهم در سلول های هوچکین مواجه شده با اسانس گیاه فوق باشد (۱۰۴).

Banerjee و همکاران نیز در سال ۲۰۱۷، اثر ضد سرطانی عصاره گیاه اسطوخودوس بر روی رده سلول های سرطانی پستان و لنفوسیت های خون محیطی انسان را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که عصاره تغلیظ شده گیاه مذکور، توانایی ایجاد آپوپتوزیس در سلول های هر دو گروه مورد آزمایش را دارد که این اثر (آپوپتوزیس) در سلول های سرطانی بیشتر بود. همچنین فعالیت کاسپاز ۹ به صورت معنی داری افزایش یافت و اثرات آپوپتوتیک ایجاد شده با افزایش غلظت عصاره گیاه مذکور ارتباط مستقیم داشت (۱۰۵).

در مطالعه دیگر که توسط Escobar و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد اثر گیاه *Minthostachys verticillat* (گیاهی معطر از خانواده Lamiaceae و هم خانواده کاکوتی) بر روی سلول های ^۱vero، PBMC^۲ و سلول های مغز استخوان موش بررسی گردید و علیرغم وجود ۶۸ درصد پولگون در ترکیبات گیاه مذکور، گیاه یاد شده نتوانست در غلظت های $1000-100 \mu g/ml$ ، روی سلول های مورد آزمایش، ایجاد آپوپتوز نماید (۱۰۶).

¹- Vero cells are a lineage of cells used in cell cultures

²- Peripheral Blood Mononuclear Cell

Abaza و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر عصاره متانولی آویشن (یکی از گیاهان هم خانواده کاکوتی) بر روی سلول های سرطانی روده و پستان انسان را مورد بررسی قرار داده و اثرات ایجاد شده را نشان دهنده توقف چرخه سلولی در فاز S و M مرحله G1 دانستند و آن را تایید کننده شروع آپوپتوزیس قلمداد کردند. محققین مذکور بیان کردند که عصاره گیاه آویشن احتمالا با تنظیم منفی عملکرد مهار کننده های آپوپتوز در سلول، باعث ایجاد آپوپتوزیس می شود و تمام این اثرات را وابسته به غلظت و زمان اثر عصاره گزارش کردند (۱۰۷).

Machado و همکاران در سال ۲۰۱۴، اثر ضد لیشمانیایی عصاره آویشن بر روی لیشمانیا اینفانتوم را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که عصاره گیاه مذکور بر روی لیشمانیا، می تواند با ایجاد تغییرات ساختاری از جمله تورم میتوکندری، خارج کردن فسفاتیدیل سرین، از دست دادن پتانسیل غشاء میتوکندری و همچنین توقف چرخه سلولی در فاز G1 و G2، باعث مرگ انگل شود و عنوان نمودند که این اثر می تواند مشابه تغییرات در مکانیسم مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) باشد. همچنین در این تحقیق بیان شد که عصاره آویشن بر روی سلول های پستانداران اثر سایتوتوکسیک نداشت (۱۰۸).

در سال ۲۰۰۹ Savini و همکاران اثر عصاره *Origanum vulgare* یا مرزنجوش (یکی از گیاهان هم خانواده کاکوتی) بر روی سلول های سرطانی روده بزرگ انسان را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که عصاره گیاه مذکور می تواند هر دو مسیر داخلی و خارجی آپوپتوزیس در سلول های مورد آزمایش را فعال کند که این تغییرات با غلظت عصاره گیاه مذکور و زمان مواجهه، ارتباط مستقیم داشت (۱۰۹).

دوست دار و همکاران، القاء آپوپتوزیس، متعاقب تاثیر عصاره گل همیشه بهار، در کارسینوم تجربی کولون موش صحرایی را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که این اثر با میزان عصاره ارتباط مستقیم دارد (۱۱۰). همچنین Jimenez و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که عصاره گل همیشه بهار می تواند در محیط کشت، سلول های سرطانی را به میزان ۷۰ تا ۱۰۰ درصد از طریق آپوپتوزیس از بین ببرد و باعث افزایش فعالیت کاسپاز ۳

گردد. این اثرات با افزایش غلظت گیاه ارتباط مستقیم داشت. در تحقیق اخیر توانایی القاء آپوپتوز توسط عصاره گل همیشه بهار، به وجود ترکیبات تری ترپن در آن نسبت داده شده است (۱۱۱).

Senathilake و همکاران در سال ۲۰۱۷، اثر عصاره متانولی برگ، پوست و دانه گیاه *Dipterocarpus zeylanicus* را بر روی انگل *Filaria setaria digitate* مطالعه نمودند و نتیجه گرفتند که عصاره گیاه مذکور باعث آپوپتوز انگل در شرایط آزمایشگاهی می گردد و همچنین فعالیت کاسپاز ۳ را نیز به مقدار معنی داری افزایش می دهد. آپوپتوزیس ایجاد شده وابسته به غلظت عصاره و زمان مواجهه بود. این محققین اثر آپوپتوتیک گیاه فوق را به وجود اسید اولئانولیک از ساپونین های تری ترپن در ترکیب عصاره مذکور مرتبط دانستند (۱۱۲).

Dai و همکاران در سال ۲۰۱۶، اثر ضد سرطانی کارواکرول (یکی از ترکیبات موجود در آویشن و اکثر گیاهان خانواده نعنائیان از جمله کاکوتی) را بر روی سلول های سرطانی اپی تلیال دهان مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که کارواکرول به میزان قابل توجهی مانع تکثیر سلول های توموری شده و با تاثیر روی مهارکننده های کاسپاز ها، باعث فعال شدن کاسپازها ی ۳ و ۹ گردید و در نتیجه باعث ایجاد آپوپتوزیس در سلول های مذکور شد که تمام این اثرات وابسته به دوز و زمان اثر دارو بود (۱۱۳). همچنین در تحقیقی مشابه که توسط Bhakki و همکاران انجام شد اثر کارواکرول را روی سلول های لوسمی پرو میلو سیتیک و لنفوسیت های T انسانی بررسی نمودند و به نتایج مشابه رسیدند و مشاهده کردند که در سلول های تحت مطالعه، فعالیت کاسپاز ۳ افزایش یافته و آپوپتوزیس ایجاد گردیده است (۱۱۴).

رازی و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر آپوپتوتیک پولگون (یکی از ترکیبات مهم موجود در گیاه کاکوتی) بر روی بافت تخمدان موش را بررسی نمودند. در این تحقیق موش ها با مقادیر ۲۵، ۵۰، و ۱۰۰ mg/kg پولگون تیمار شدند. پس از بررسی بافت تخمدان، نتیجه حاصل حاکی از ایجاد آپوپتوزیس روی بافت تخمدانی بود و این اثر متناسب با افزایش غلظت پولگون بود (۱۱۵).

Chauhan و همکاران در سال ۲۰۱۷، اثر تیمول روی سرطان کولون را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که تیمول با فعال کردن کاسپاز های ۸ ، ۹ و مهار استرس اکسیداتیو، باعث فعال کردن مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) می شود (۱۱۶). در تحقیقی مشابه که توسط Li و همکاران انجام شد اثر تیمول بر روی رشد سلول های سرطانی مثانه بررسی گردید و نتیجه گرفته شد که ایجاد آپوپتوزیس و افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ ، وابسته به دوز دارو و زمان انکوباسیون است (۱۱۷).

نصیرزاده و همکاران در سال ۱۳۹۴، اثر سیلی بینین (یک فلاونوئید گیاهی) در القاء آپوپتوزیس و افزایش فعالیت کاسپاز ۹، در سلول های اپیتلیال بند ناف در غلظت های ۴۰۰-۱۰۰ میکرومولار و زمانهای مختلف را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که بیشترین آپوپتوزیس توسط ترکیب فوق در بالاترین غلظت ایجاد شد، ولی بیشترین فعالیت کاسپاز ۹ در غلظت ۱۰۰ میکرومولار بدست آمد (۱۱۸).

علاوه بر تحقیقات فوق، بررسی های دیگری در مورد مکانیسم های مختلف آپوپتوزیس بر روی پروتواسکولکس ها صورت گرفته است، چنانکه Hu و همکاران در سال ۲۰۱۱ تاثیر H_2O_2 و دگزامتازون در آپوپتوزیس پروتواسکولکس ها را مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق مذکور پروتواسکولکس های کیست هیداتید در مجاورت ۱ mmol/L، H_2O_2 و ۵ mmol/L دگزامتازون به مدت ۸ ساعت انکوبه شدند و سپس ایجاد آپوپتوزیس را به وسیله میکروسکوپ الکترونی و روش TUNEL^۱ بررسی نموده و افزایش فعالیت کاسپاز های ۱ و ۳ را نیز با روش های ایمونوهیستوشیمی و رنگ سنجی مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق فوق نشان داده شد که سلول های تیمار شده با H_2O_2 و دگزامتازون با غلظت های مذکور می توانند باعث ایجاد آپوپتوزیس در پروتواسکولکس های کیست هیداتید شده و فعالیت کاسپاز های ۱ و ۳ را نیز افزایش دهند که فقط افزایش کاسپاز ۳ معنی دار بود (۱۲). در تحقیقی مشابه در سال ۲۰۱۲ نیز، آپوپتوزیس حاصل از دارو درمانی ناشی از پرازی کوانتل بر علیه اکینوкокوس گرانولوزوس توسط De و همکارانش گزارش گردید. در تحقیق مذکور

¹ - Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling

فعالیت کاسپاز ۳ پس از درمان با داروی مذکور به میزان معنی داری افزایش یافت و قطعات نوکلئوزوم و DNA به عنوان شاخص آپوپتوزیس، مورد شناسایی قرار گرفتند (۱۱۹).

در تحقیقی دیگر، Pensel و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر اسانس گیاهان آویشن باغی و مرزنجوش (از گیاهان هم خانواده کاکوتی) بر روی پروتو اسکولکس های کیست هیداتید را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که گیاهان مذکور بعد از ۱۶ ساعت می توانند در پروتواسکولکس های کیست هیداتید آپوپتوزیس ایجاد نمایند. در این تحقیق مقدار تیمول موجود در اسانس گیاهان را به میزان $10 \mu g/ml$ تنظیم نمودند و هم زمان با اسانس گیاهان، اثر تیمول را نیز به تنهایی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که آپوپتوزیس ناشی از تیمول در مدت ۸ ساعت ایجاد شد (۱۲۰).

همچنین اثر مواد مختلف از جمله ATP و دگزامتازون بعنوان القاء کننده آپوپتوزیس در پروتواسکولکس ها گزارش شده (۱۲۱) و نشان داده شده که آپوپتوزیس در غیر بارور بودن کیست های هیداتید نقش داشته و بیان مولکول های القاء کننده آپوپتوزیس در سطح لایه ژرمینال کیست های نابارور، نسبت به کیست های بارور و بافت سالم در سطح بالاتری قرار دارد (۸۴).



تصویر ۷: گیاه کاکوتی (برگ)



تصویر ۸ : گیاه کاکوتی (گل)

فصل سوم

اهداف و فرضیات :

الف-هدف اصلی طرح :

تعیین اثر آپوپتوتیک گیاه دارویی کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک

ب-اهداف فرعی :

- تعیین اثر آپوپتوتیک رقت های مختلف گیاه دارویی کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک.
- تعیین اثر رقت های مختلف گیاه دارویی کاکوتی بر تولید کاسپاز ۹ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک.
- تعیین اثر رقت های مختلف گیاه دارویی کاکوتی بر تولید کاسپاز ۳ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک.
- تعیین اثر رقت های مختلف گیاه دارویی کاکوتی بر تولید کاسپاز ۸ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک.

ج-اهداف کاربردی:

شناسایی داروهای گیاهی با غلظت های مشخص که به روش آپوپتوزیس سبب مرگ پروتواسکولکس ها شده و بتوانند در آینده بعنوان یک دارو با عوارض کمتر استفاده شوند.

د-فرضیه ها (Hypothesis) یا سؤال های پژوهش:

- رقت های مختلف گیاه دارویی کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک دارای اثر آپوپتوتیک است.
- رقت های مختلف گیاه دارویی کاکوتی بر تولید کاسپاز ۹ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک موثر است.

- رقت های مختلف گیاه دارویی کاکوتی بر تولید کاسپاز ۳ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک موثر است.

- رقت های مختلف گیاه دارویی کاکوتی بر تولید کاسپاز ۸ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک موثر است.

جدول ۱ : متغیرها:

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه ای		
ویابیلیتی کیست های هیداتیک		✓			✓		زنده ماندن پروتواسکولکس ها در لوله های حاوی نمونه های مورد آزمایش	رنگ پذیری یا عدم رنگ پذیری با انوزین ۱/۰٪
اثرعصاره گیاه دارویی	✓				✓		اثر گذاری عصاره گیاهان دارویی روی پروتواسکولکس ها	دارد / ندارد
کاسپاز		✓	✓				مقدار ماده تولید شده در مایع رویی حاصل از کشت سلولی	میکرومول
مرگ آپوپتوز		✓	✓				مقدار درصد مرگ پروتواسکولکس	درصد

نوع مطالعه :

(پایه- تجربی) **Controld traial**

بررسی های آماری :

داده های جمع آوری شده توسط نرم افزار آماری SPSS، آنالیز و با استفاده از جداول و نمودارهای مناسب نمایش داده شده و سپس با آزمون های آماری t-test ، آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی داری آزمون ها ۵٪ در نظر گرفته شد.

فصل چهارم

مواد و روش ها

تجهیزات مورد نیاز :

- ۱- سمپلر متغیر ۵-۱۰ لاندا
- ۲- سمپلر متغیر ۱۰-۱۰۰ لاندا
- ۳- سمپلر متغیر ۱۰۰-۱۰۰۰ لاندا
- ۴- پنس
- ۵- قیچی
- ۶- اسکالپل
- ۷- سانتریفیوژ
- ۸- میکروسانتريفيوژ
- ۹- ترازوی دیجیتال
- ۱۰- انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵٪ CO₂
- ۱۱- اتوکلاو
- ۱۲- الایزا ریدر با طول موج ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر
- ۱۳- PH متر
- ۱۴- تایمر
- ۱۵- هود

وسایل مصرفی :

۱- پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه ته صاف

۲- پلیت الیزا

۳- سرنگ ۵ و ۱۰ سی سی

۴- لام

۵- لامل

۶- لوله فالكون ۱۵ و ۵۰ سی سی

۷- پیپت پاستور

۸- میکروتیوب در سایزهای مختلف

۹- سر سمپلر زرد

۱۰- سر سمپلر آبی

۱۱- سر سمپلر کریستالی

۱۲- بر چسب

۱۳- دستکش لاتکس

۱۴- دستکش یکبار مصرف

محلول ها و مواد مصرفی :

۱- جنتا مایسین

۲- بافر PBS با PH ۷/۴- ۷/۲ (NaCl 8gr, KCL 0.2 gr , 1.150 gr, KH_2PO_4 0.2 gr) مواد فوق

در مقداری آب مقطر حل شده و در نهایت به حجم ۱ لیتر رسانده شد. سپس PH آن با PH متر تنظیم

شده و اتوکلاو گردید . پس از خارج کردن از اتوکلاو و خنک نمودن آن، مقدار ۱ میلی لیتر جنتا مایسین به آن اضافه شد.

۳- الکل ۷۰ درجه

۴- عصاره گیاه دارویی کاکوتی

۵- سرم فیزیولوژی

۶- بافر (DMSO (Merk)

کیت های مورد نیاز :

۱- کیت مرگ سلولی Cell Death Detection ELISAPLUS (Roche)

۲- کیت کاسپاز ۳ Caspase 3 Assay Kit Colorimetric (Abcam)

۳- کیت کاسپاز ۸ Caspase 8 Assay Kit Colorimetric (Abcam)

۴- کیت کاسپاز ۹ Caspase 9 Assay Kit Colorimetric (Abcam)

۵- کیت اندازه گیری پروتئین به روش برادفورد (Biotek)

۶- محیط کشت سلولی RPMI 1640 (Gibco)

روش کار :

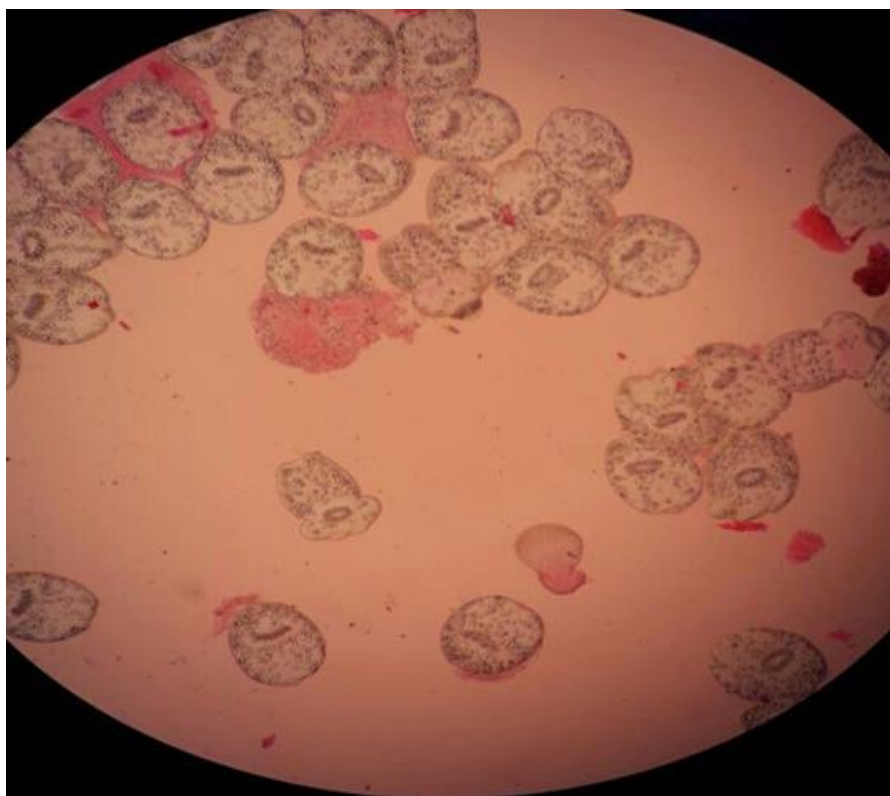
تهیه عصاره گیاهی :

گیاه کاکوتی توسط متخصص گیاه شناسی از مزرعه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج شناسایی و جمع آوری شد. یک نمونه از گیاه، در پژوهشکده ثبت و نگهداری و بقیه در سایه خشک شد. برای تهیه عصاره، پس از خشک کردن و آسیاب کردن گیاه (مقدار نیم کیلوگرم) ابتدا توسط اتانول و به وسیله دستگاه پرکولاتور عصاره گیری انجام شد. این عمل سه بار تکرار و سپس عصاره حاصل بوسیله دستگاه تقطیر در خلاء

تخلیظ گردید. میزان عصاره خشک شده محاسبه و در ظروف پلیت دردار، داخل یخچال تا هنگام آزمایش نگهداری شد (۱۲۲).

تهیه کیست های هیداتید و جدا سازی پروتواسکولکس ها :

کبد و ریه های آلوده به کیست هیداتید، از کشتارگاه قزوین تهیه و به بخش انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین منتقل شدند. سطوح خارجی کیست ها با محلول بتادین و الکل ۷۰ درجه ضد عفونی شده و با رعایت شرایط استریل، محتویات کیست ها با سرنگ تخلیه و در زیر هود، در لوله های فالكون استریل ریخته شد. سپس با تیغ اسکالپل استریل، جدار کیست ها پاره شده و پروتواسکولکس ها کاملاً جمع آوری و به لوله ها اضافه شد. برای اطمینان از مناسب بودن نمونه های بدست آمده، پس از سانتیفریوژ آنها، از رسوب حاصله که حاوی پروتواسکولکس ها بود، مقداری برداشته و پس از رنگ آمیزی با اتوزین ۰/۱ درصد در زیر میکروسکوپ، درصد زنده بودن (Viability) آنها بررسی گردید. پروتواسکولکس هایی که Viability آنها بالای ۹۰٪ بود، جهت آزمایش انتخاب شدند. پروتواسکولکس های جمع آوری شده، با محلول PBS حاوی جنتا مایسین، ۳ بار شستشو داده شده و رسوب حاصله وارد لوله های فالكون استریل حاوی ۵ میلی لیتر PBS گردیده و به یخچال منتقل شدند. جهت بررسی آپوپتوزیس و اندازه گیری کاسپاز ها در نمونه های جمع آوری شده، تعداد پروتواسکولکس ها در حجم معین PBS، مشخص گردید. جهت این کار پس از مخلوط کردن کامل پروتواسکولکس ها، مقدار ۲۰۰ لاندا از آن برداشته و در یک میکروتیوب ریخته شد و پس از Spin کردن کامل محتویات میکروتیوب مذکور، مقدار ۲۰ لاندا از آن روی لام گذاشته شده و پروتواسکولکس ها در زیر میکروسکوپ شمارش گردید. در نهایت تعداد کل پروتواسکولکس ها در حجم نهایی محاسبه و برای مراحل بعدی آزمایش، در یخچال قرار داده شد (۱۲۳).



تصویر ۹ : پروتواسکولکس های زنده اکینوکوکوس گرانولوزوس قبل از مواجهه با عصاره گیاه کاکوتی

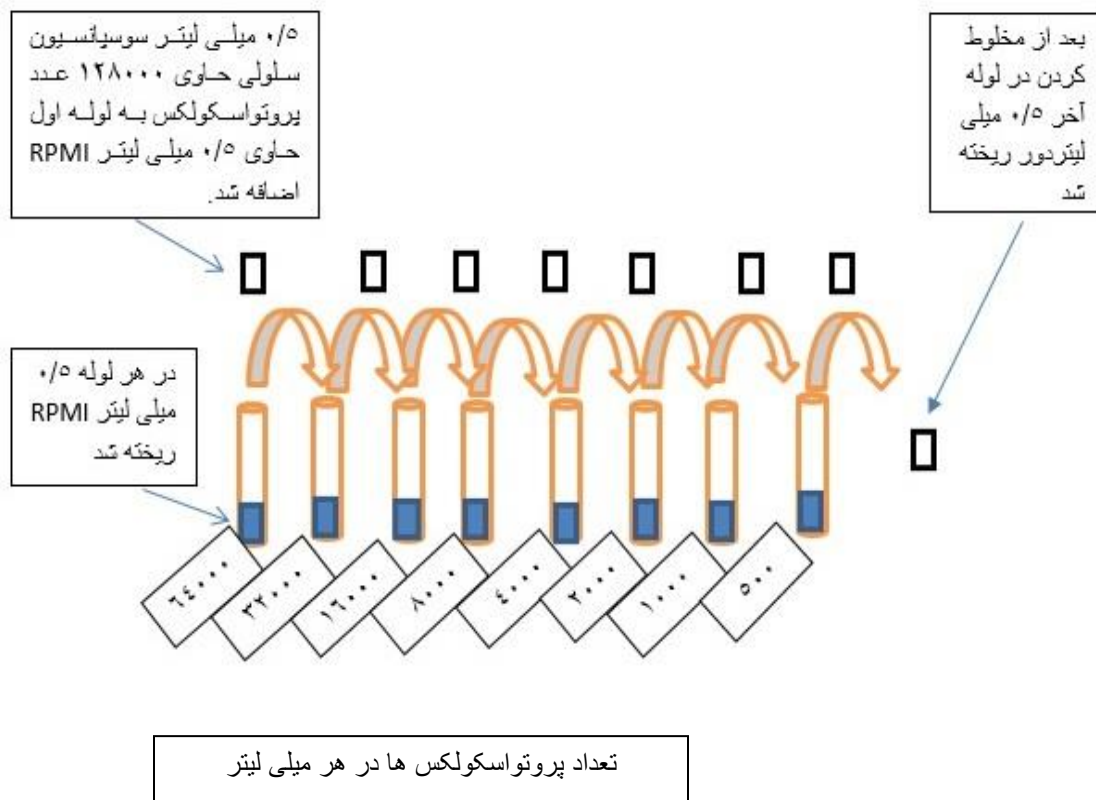
تعیین تعداد مناسب پروتواسکولکس ها جهت مواجهه با عصاره گیاه کاکوتی:

بر اساس دستورالعمل کیت اندازه گیری کاسپاز های ۳، ۸ و ۹، لازم بود تعداد مناسب پروتواسکولکس ها، جهت مجاور کردن با عصاره گیاه کاکوتی و همچنین مقدار پروتئین نمونه های نهایی مورد آزمایش، مشخص شود. طبق دستورالعمل مذکور، میزان پروتئین قابل اندازه گیری، بین $200 - 50 \mu\text{g}$ و تعداد مناسب سلول های مورد استفاده، $10^6 \times 5-1$ توصیه شده است. به علت بزرگ بودن پروتواسکولکس ها، باید تعداد آنها طوری در نظر گرفته می شد که در نهایت میزان پروتئین نمونه های بدست آمده از لیز آنها توسط بافر لیز کننده^۱، بین $200 - 50 \mu\text{g}$ باشد. لذا برای بدست آوردن این تعداد، رقت های سریالی از پروتواسکولکس ها به ترتیب به تعداد ۶۴۰۰۰، ۳۲۰۰۰، ۱۶۰۰۰، ۸۰۰۰، ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰ با RPMI تهیه شد. جهت این کار ۸ لوله انتخاب و در همه لوله ها مقدار 0.5 ml RPMI ریخته شد. سپس 0.5 ml از سوسپانسیون پروتواسکولکس ها که حاوی ۱۲۸۰۰۰ پروتواسکولکس در میلی لیتر بود به لوله اول اضافه گردید. بعد از مخلوط کردن، 0.5 ml از آن به لوله بعدی منتقل شده و این کار تا لوله آخر ادامه یافت. در نهایت 0.5 ml از لوله آخر بیرون ریخته شد (تصویر ۱۰). در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از رقت های مذکور با ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه کاکوتی با موثرترین غلظت که در تحقیقات قبلی مشخص شده (100 mg/ml) (۱۰۱) (۱۰۱)، مجاور گردید و تحت شرایط مورد اشاره در کیت های فوق الذکر (دمای ۳۷ درجه، با حضور Co_2 و به مدت ۴ ساعت) انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، محتویات میکروتیوب ها (سوسپانسیون پروتواسکولکس ها و عصاره گیاه) به مدت ۱۰ دقیقه با 2 RCF ۲۰۰ سانتریفیوژ شدند و در نهایت محلول رویی دور ریخته شد. پروتواسکولکس های رسوب کرده سه بار با محلول PBS شستشو داده شدند تا بقایای عصاره گیاهی کاملاً از محیط خارج شود. سپس به رسوب پروتواسکولکس ها بافر لیز کننده اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ

^۱- Lysis buffer

^۲- Relative centrifugal force

انکوبه گردید. در ادامه مجدداً با شرایط فوق، سانتریفیوژ تکرار و محلول رویی^۱ جدا و لیبل گذاری شد. جهت تعیین میزان پروتئین نمونه های مذکور از روش براد فورد استفاده شد.



تصویر ۱۰ : روش تهیه رقت های سریالی از پروتواسکولکس ها

^۱- supernatant liquid

تعیین میزان پروتئین مایع رویی حاصل از لیز پروتواسکولکس ها، با استفاده از روش براد فورد:

کیت اندازه گیری پروتئین، حاوی آلبومین سرم گاو^۱ با غلظت ۵ mg/ml به عنوان استاندارد ذخیره و محلول برادفورد بود. جهت رسم منحنی استاندارد، ابتدا استاندارد ذخیره (آلبومین) به نسبت ۱:۱۰ با PBS رقیق و غلظت ۵۰۰ µg/ml تهیه گردید. سپس ۸ لوله آزمایش انتخاب و به هریک مطابق جدول شماره ۲، مقادیری از محلول استاندارد رقیق شده، محلول رقیق کننده و معرف براد فورد اضافه گردید تا غلظت های ۲۵ ، ۰ ، ۵۰ ، ۱۰۰ ، ۲۰۰ ، ۳۰۰ ، ۴۰۰ و ۵۰۰ از استاندارد تهیه شود. در نهایت ۸ لوله نیز جهت رقت های تهیه شده از محلول رویی حاصل از لیز پروتواسکولکس ها در نظر گرفته شد. به این لوله ها ۲۰ لانداسوسپانسیون حاصل از لیز پروتواسکولکس ها و ۲۰۰ لاندا محلول براد فورد اضافه گردید و بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب نوری لوله ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد (جدول ۳).

جدول ۲ : محلول های لازم و مقادیر آنها برای رسم منحنی استاندارد تست براد فورد

Number of Tubes solutions	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA ST ¹ (µL)	0	1	2	4	8	12	16	20
Diluent ² (µL)	20	19	18	16	12	8	4	0
Bradford solution (µL)	200	200	200	200	200	200	200	200
Concentration (µg/ml)	0	25	50	100	200	300	400	500

1-Bovine serum albumin standard

2- PBS buffer or normal saline

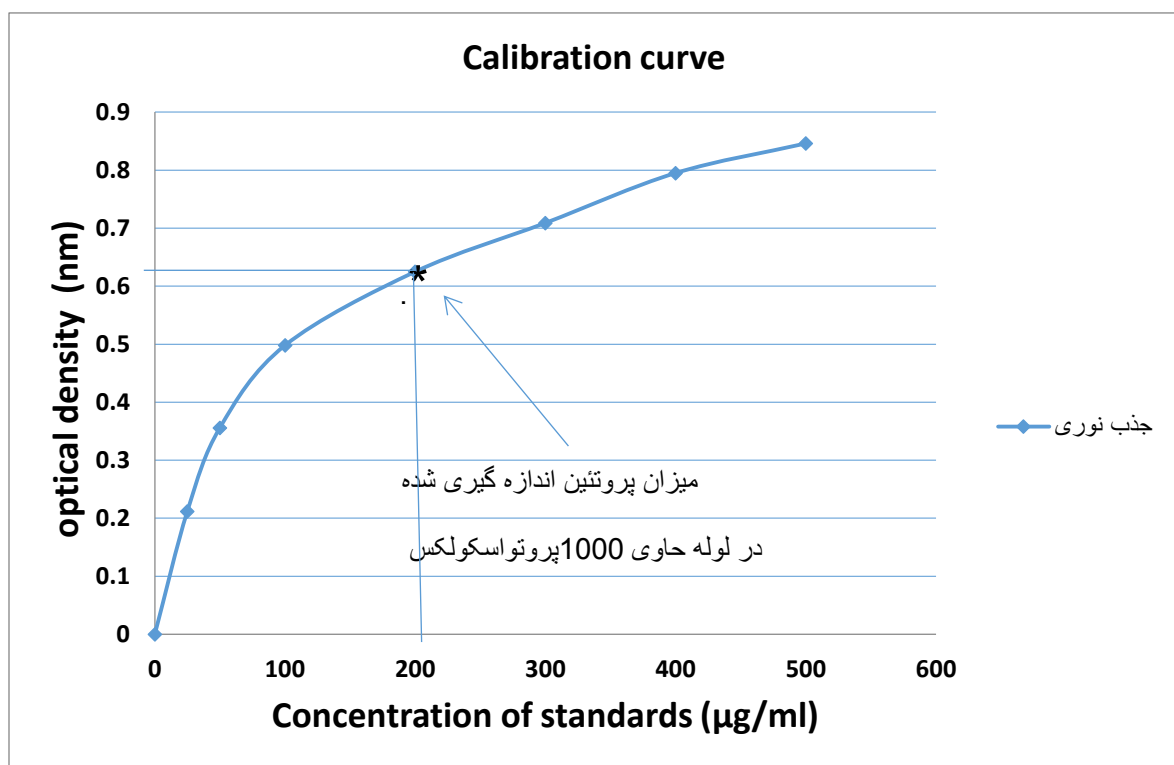
¹- BSA : Bovine serum albumin

جدول ۳: محلول های لازم و مقادیر آنها برای تعیین میزان پروتئین مایع رویی حاصل از پروتواسکولکس ها

Number of Tubes solutions	1	2	3	4	5	6	7	8
Sample (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20
Bradford solution (μL)	200	200	200	200	200	200	200	200
Number of protoscolices	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000
Optical density (595 nm)	0.324	0.619	0.859	1.04	1.95	>2	>2	>2
Concentration(μg/ml)	42	200	495	>500	>500	>500	>500	>500

بعد از خواندن جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها، منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار اکسل ترسیم و جذب نوری نمونه ها با منحنی استاندارد مقایسه گردید. تعداد مناسب پروتواسکولکس ها که بعد از انکوباسیون، باعث آزاد شدن حدود ۲۰۰ میکروگرم پروتئین شده بود، ۱۰۰۰ عدد در میلی لیتر بدست آمد (منحنی ۱).

منحنی ۱ : منحنی کالیبراسیون تست براد فورد و مقایسه جذب نوری supernatant حاصل از پروتواسکولکس ها با جذب نوری استانداردها



تهیه رقت های ۵ mg/ml ، ۵۰ و ۱۰۰ از عصاره گیاه دارویی کاکوتی:

ابتدا مقدار ۰/۸ گرم از عصاره گیاه دارویی کاکوتی با ترازوی دیجیتال (با دقت ۴ رقم اعشار) وزن و در ۰/۵ میلی لیتر محلول DMSO حل گردید. بعد از حل شدن کامل عصاره، حجم محلول با سرم فیزیولوژی استریل به ۲ ml رسانده شد تا غلظت ۴۰۰ mg/ml بدست آید. سپس رقت های ۱۰۰، ۱۰، ۱ mg/ml و ۲۰۰ از رقت مذکور تهیه گردید. (با توجه به اینکه رقت ها ی تهیه شده مجددا توسط سوسپانسیون پروتواسکولکس ها به میزان $\frac{1}{2}$ رقیق می شوند، لذا یک رقت بالاتر تهیه گردید).

روش انجام آزمایش آپوپتوزیس بر اساس کیت : Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche)
محتویات کیت (Kit Contents):

ویال / بطری رنگ	برچسب	محتویات / کاربرد
۱ قرمز	Anti-Histone-Biotin	<ul style="list-style-type: none"> • آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده از موش (clone H11-4) • کونژوگه شده با بیوتین • لیوفلیزه • پایدار • جهت متصل شدن به اجزای هیستون و تشکیل کمپلکس ایمنی با بیوتین در میکروپلیت
۲ سفید	Anti-DNA-POD ¹	<ul style="list-style-type: none"> • آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده از موش (clone MCA-33) • کونژوگه شده با پراکسیداز • لیوفلیزه • پایدار • جهت متصل شدن به قطعات DNA و ایجاد واکنش رنگی با سبوسترای ABTS
۳ آبی	Positive Control	<ul style="list-style-type: none"> • کمپلکس DNA-Histone • لیوفلیزه • پایدار
۴ سبز	بافر انکوباسیون	<ul style="list-style-type: none"> • ۱۰۰ میلی لیتر • آماده مصرف
۵ قرمز	بافر لیز کننده	<ul style="list-style-type: none"> • ۱۰۰ میلی لیتر • آماده مصرف
۶ بی رنگ	بافر سبوسترا	<ul style="list-style-type: none"> • ۱۵ میلی لیتر • آماده مصرف • برای حل کردن قرص های ABTS
۷ سفید	سبوسترای آنزیم پراکسیداز ABTS ² Substrate Tablet	<ul style="list-style-type: none"> • ۳ قرص • هر کدام برای تهیه ۵ میلی لیتر محلول سبوسترا
۸ بی رنگ	محلول متوقف کننده ABTS	<ul style="list-style-type: none"> • ۱۰۰ میلی لیتر • جهت متوقف کردن واکنش رنگی سبوسترای ABTS
۹	میکروپلیت	<ul style="list-style-type: none"> • ۱۲ ردیف میکروپلیت (هر کدام حاوی ۸ چاهک) • کوت شده با استرپتو آویدین
۱۰	چسب برای پوشاندن میکروپلیت	<ul style="list-style-type: none"> • ۴ ورق چسب پوشاننده • جهت پوشاندن میکرو پلیت

¹- Anti-DNA Peroxidase

²- ABTS Tablets are used as substrates in enzyme immunoassays with horseradish peroxidase as a marker enzyme

- ۱- پودر لیوفلیزه Anti- Histone Biotin با در قرمز (آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده از موش clone H11-4 که با بیوتین کونژوگه شده).
- ۲- پودر لیوفلیزه Anti-DNA POD (آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده از موش clone MCA-33 که با پراکسیداز کونژوگه شده).
- ۳- کنترل مثبت
- ۴- محلول انکوباسیون (Incubation Buffer)
- ۵- محلول لیز کننده (Lysis Buffer)
- ۶- محلول سوبسترا (Substrate Buffer)
- ۷- ABTS Tablets سوبسترای آنزیم پراکسیداز که به صورت قرص در کیت تعبیه شده است و در هنگام آزمایش باید در ۵ میلی لیتر محلول سوبسترا حل شود .
- ۸- محلول متوقف کننده (ABTS Stop Solution)
- ۹- میکروپلیت
- ۱۰- چسب برای پوشاندن میکروپلیت

آماده کردن محلول های کار (Working solutions):

:

ویال) محتویات	آماده سازی	مورد استفاده	شرایط نگهداری
Anti-Histone Biotin(۱)	در ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر حل و کاملاً مخلوط شد.	قسمتی از محلول ایمنی	در دمای ۲ تا ۸ درجه دو ماه پایدار است.
Anti-DNA POD(۲)	در ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر حل و کاملاً مخلوط شد.	قسمتی از محلول ایمنی	در دمای ۲ تا ۸ درجه دو ماه پایدار است.
Positive Control(۳)	در ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر حل و کاملاً مخلوط شد.	ELISA مرحله ۱	در دمای ۲ تا ۸ درجه دو ماه پایدار است.
ABTS Tablets(۷)	هر قرص ABTS در ۵ml محلول سوپسترا (ویال ۶) حل شد	ELISA مرحله ۵	۱ ماه دور از نور و دمای ۲ تا ۸ درجه پایدار است.
ABTS Stop Solution (۸)	آماده مصرف (در صورت کدر بودن باید در ۳۷ درجه قرار گیرد).	ELISA مرحله ۶	در دمای ۲ تا ۸ درجه قبل از تاریخ مصرف، پایدار است.

۱- Anti-Histone Biotin (پودر لیوفلیزه آنتی هیستون بیوتین + ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر)

۲- Anti-DNA POD (پودر لیوفلیزه Anti-DNA POD + ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر)

۳- Positive Control (پودر لیوفلیزه کنترل مثبت + ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر)

مواد فوق ۱۰ دقیقه کاملاً مخلوط شدند.

۴- محلول ABTS (بسته به تعداد نمونه ها هر قرص ABTS در ۵ ml محلول سوبسترا حل شد. پایداری این محلول در تاریکی ۱ ماه است).

۵- محلول ایمنی (Immunoreagent): (۱حجم Anti-DNA POD + ۱حجم Anti-Histone Biotin + ۱۸ حجم از محلول انکوباسیون). این محلول باید تازه تهیه شود (تصویر ۱۱).

۶ - کنترل منفی : از پروتواسکولکس های بدون مواجهه با دارو بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

۷- نمونه مورد آزمایش : از فراکشن های سیتو پلاسمیک ناشی از لیز پروتواسکولکس ها بعد از مواجهه با گیاه دارویی کاکوتی استفاده گردید. برای تهیه این فراکشن ها، تعداد پروتواسکولکس ها در لوله فالكونی که از قبل تهیه شده بود، شمارش شد و به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در میلی لیتر تنظیم گردید. به طوریکه ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون حاوی ۱۰۰۰ عدد پروتواسکولکس بود. تعداد ۱۰ عدد میکروتیوب برای ۳ رقت از دارو و کنترل ها لیبیل گذاری شد. سپس در همه آنها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون پروتواسکولکس آماده شده، ریخته شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ لاندا از رقت های تهیه شده گیاه دارویی کاکوتی و کنترل مثبت اضافه شد. در کنترل منفی ۱۰۰ لاندا محیط کشت RPMI اضافه گردید. میکروتیوب ها کاملا مخلوط شده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه و در مجاورت ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. بعد از این مرحله میکروتیوب ها سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. پروتواسکولکس ها ۳ بار با محلول PBS شستشو داده شدند تا بقایای عصاره گیاهی کاملا از محیط خارج شود سپس مقدار ۲۰۰ لاندا Lysis Buffer به رسوب باقیمانده، اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ظرف حاوی یخ انکوبه شدند. در مرحله بعد مجددا سانتریفیوژ بعمل آمده و محلول رویی در میکروتیوب های مشخص شده برای آزمایش الایزا جدا شدند. این نمونه ها پایداری کمی داشته، لذا در هنگام آزمایش در یخ قرار گرفته و سریعاً طبق مراحل زیر آزمایش شدند.



تصویر ۱۱: کیت تشخیص مرگ سلولی از طریق آپوپتوزیس (Roche) Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

روش انجام آزمایش الایزا جهت بررسی آپوپتوزیس:

- ۱- ۲۰ لاندا از نمونه های آماده شده از مرحله قبل و همچنین ۲۰ لاندا از کنترل مثبت و منفی در چاهک های میکروپلیت الایزا ریخته شد.
 - ۲- سپس ۸۰ لاندا از Immunoreagent آماده، به آن اضافه گردید. روی میکروپلیت با برچسب مخصوص پوشانده شده و روی شیکر با ۳۰۰ دور در دقیقه، برای مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد.
 - ۳- بعد از پایان انکوباسیون، محلول رویی تخلیه و ۳ مرتبه با محلول شماره ۴ شستشو داده شد.
 - ۴- ۱۰۰ لاندا از محلول ABTS به چاهک ها اضافه شده و میکروپلیت، روی شیکر با ۲۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، در این مرحله تغییر رنگ در چاهک ها مخصوصا در چاهک کنترل مثبت مشاهده شد. در یک چاهک، فقط ۱۰۰ لاندا از محلول ABTS بعنوان بلانک ریخته شد.
 - ۵- ۱۰۰ لاندا محلول متوقف کننده ABTS به چاهک ها اضافه شد.
 - ۶- سپس جذب نوری چاهک ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد.
- * تمام مراحل فوق ۳ بار در زمان های مختلف و هر بار به صورت دو تایی تکرار و نتایج ثبت گردید.

روش اندازه گیری فعالیت کاسپاز ها ۳ ، ۸ و ۹ بر اساس کیت های شرکت abcam

محتویات کیت ها و آماده کردن محلول ها :

۱- Cell Lysis Buffer : آماده مصرف بوده و قبل از مصرف به دمای اتاق رسانده شد.

۲- Reaction Buffer : آماده مصرف بوده و قبل از مصرف به دمای اتاق رسانده شد.

۳- سوسترای اختصاصی کاسپاز ها : که در دمای ۲۰- سانتی گراد پایدار بوده و در موقع آزمایش Aliquot

گرفته و به اندازه مصرف برداشته شد و بقیه مجدداً به فریزر برگردانده شد.

- سوسترای اختصاصی کاسپاز ۳ (DEVD-p-NA^۱)

- سوسترای اختصاصی کاسپاز ۸ (IEHD-p-NA^۲)

- سوسترای اختصاصی کاسپاز ۹ (LEHD-p-NA^۳)

۳- DTT^۴ ۱ مولار: که بعد از باز شدن کیت، به مقدار ۱۰ لاندرا در هر میکروتیوب Aliquot شد و بقیه

مجدداً به فریزر ۲۰- درجه منتقل گردید.

۴- Dilution buffer : آماده مصرف بوده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد پایدار است.

اصول اندازه گیری در کیت های مذکور مشابه بوده و بر اساس خاصیت پروتئازی کاسپاز ها استوار است به

طوری که هر کاسپاز فقط می تواند ماده پارا نیتروآنیلین را از سوسترای اختصاصی خود جدا کند. پارا

نیتروآنیلین در طول موج ۴۰۰ یا ۴۰۵ نانومتر دارای جذب نوری است و افزایش جذب نوری در مقابل کنترل

منفی نشان دهنده افزایش فعالیت کاسپاز می باشد. برای اندازه گیری فعالیت کاسپاز ها، مراحل تهیه نمونه ها

همانند روش آپو توپوزیس انجام گردید. اما به علت نیاز به مقادیر بیشتری از نمونه حاصل از لیز پروتواسکولکس

¹- Asp / D, Glu / E, Val / V, Asp / D amino acids attached to Para-nitroanilin

²- Ile / I, Glu / E, Thr / T, Asp/D amino acids attached to Para-nitroanilin

³- Leu / L, Glu / E, His / H, Asp/D amino acids attached to Para-nitroanilin

⁴- Dithiothreitol (Reducing agent)

ها، حجم سوسپانسیون سلولی و رقت های مختلف گیاه دارویی کاکوتی به همان نسبت بیشتر در نظر گرفته شد. یعنی ۵۰۰ لاندا از سوسپانسیون پروتواسکولکس که حاوی ۵۰۰۰ سلول بود با ۵۰۰ لاندا از رقت های مختلف گیاه دارویی کاکوتی مجاور شده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵٪ CO_2 قرار داده شد. بعد از انکوباسیون، مراحل آزمایش به شرح زیر و بر اساس دستورالعمل کیت ادامه پیدا کرد:

۱- بعد از پایان انکوباسیون، میکروتیوب ها با RCF, ۲۰۰ g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. پروتواسکولکس ها ۳ بار با PBS شستشو گردید، سپس ۵۰ لاندا بافر لیز کننده سرد روی آنها اضافه شده و بعد از مخلوط کردن، ۱۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند.

۲- بعدا با دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد.

۳- بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی سریعآ جدا شده و در یخ قرار داده شد.

۴- تعداد ۱۰ چاهک الایزا انتخاب و لیبل گذاری گردید. سپس ۵۰ لاندا از نمونه های بدست آمده و کنترل منفی به صورت دو تایی داخل آنها ریخته شد. برای حذف رنگ زمینه، در یک چاهک ۵۰ لاندا Reaction Buffer اضافه گردید.

۵- مقدار مورد نیاز محلول واکنش (Reaction Mix)، به نسبت ۵۰ لاندا Reaction Buffer و ۰/۵ لاندا DTT در نظر گرفته شد.

۶- ۵۰ لاندا از محلول آزمایش (Reaction Mix)، در هر چاهک ریخته شد.

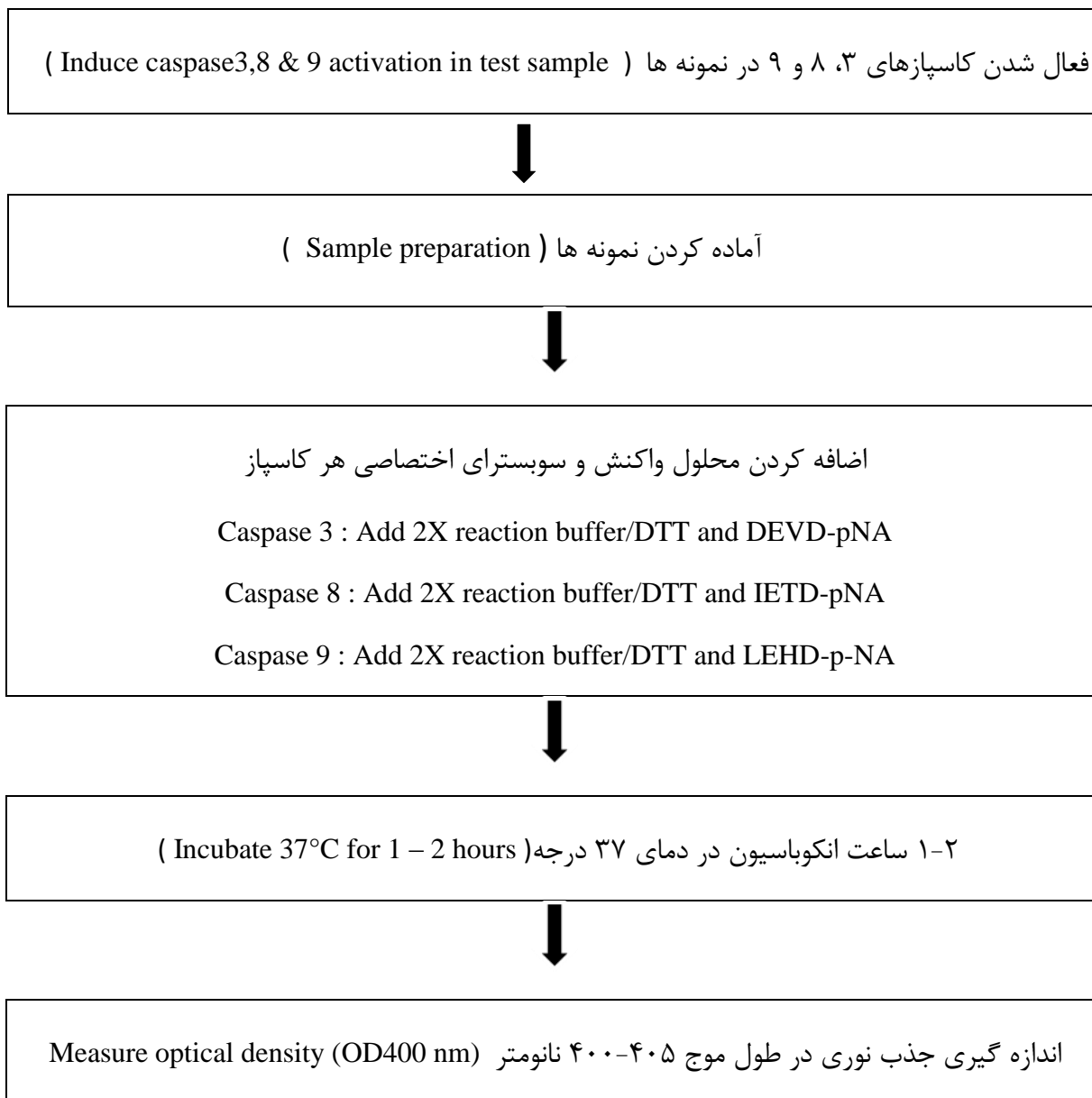
۷- ۵ لاندا از سوبسترای اختصاصی هر کاسپاز به چاهک ها اضافه شد.

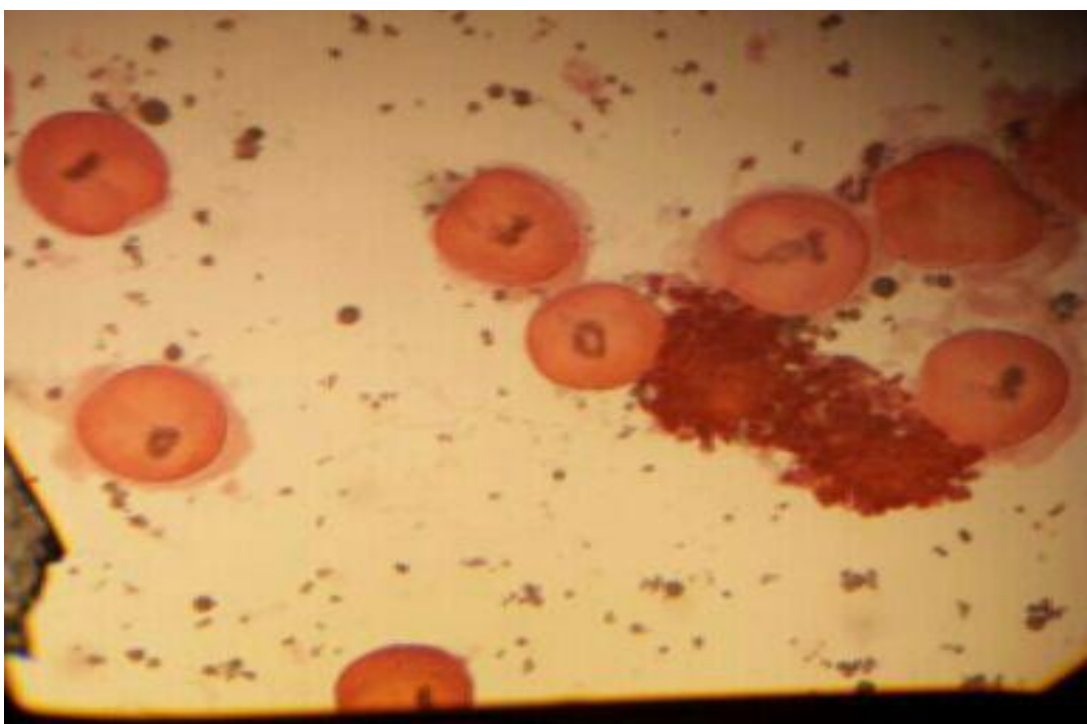
۸- پس از مخلوط کردن محتویات چاهک ها، چاهک ها ی مذکور به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند.

۹- در نهایت ، نتایج در طول موج ۴۰۵ نانومتر الایزا قرائت و نتایج مذکور ثبت گردید.

ASSAY SUMMARY

خلاصه اندازه گیری





تصویر ۱۲ : پروتواسکولکس های مرده اکینوکوکوس گرانولوزوس بعد از مواجهه با عصاره گیاه کاکوتی

فصل پنجم

یافته ها

در این مطالعه اثر آپوپتوتیک گیاه کاکوتی با غلظت های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ در مدت ۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بررسی شد. همچنین اثر گیاه مذکور در رقت ها و شرایط فوق، در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ از پروتواسکولکس های کیست هیداتید، مورد بررسی قرار گرفت. از سوسپانسیون حاوی پروتواسکولکس ها در محیط کشت RPMI، بدون مواجهه با عصاره گیاه، به عنوان کنترل منفی استفاده شد. آزمایش ۳ بار و هر بار به صورت دوتایی تکرار شد. نتایج در جداول شماره ۵ تا ۸ و نمودار های ۱ تا ۸ خلاصه شده است.

چنانکه در جدول شماره ۵ مشخص است، گیاه کاکوتی در تمامی رقت های مورد استفاده دارای اثر آپوپتوتیک بر روی پروتواسکولکس ها بود که این اثر در مقایسه با کنترل منفی فقط در غلظت های ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ و به ترتیب به میزان ۳۲/۸۵ و ۴۰/۲۵ در صد معنی دار بود ($P < 0.05$). همچنین نمودار های شماره ۱ و ۲ افزایش معنی دار میانگین جذب نوری و افزایش درصد آپوپتوزیس در پروتواسکولکس های مواجهه شده با رقت های مذکور (۵۰ و ۱۰۰) از عصاره کاکوتی را تایید می کند ($P < 0.05$).

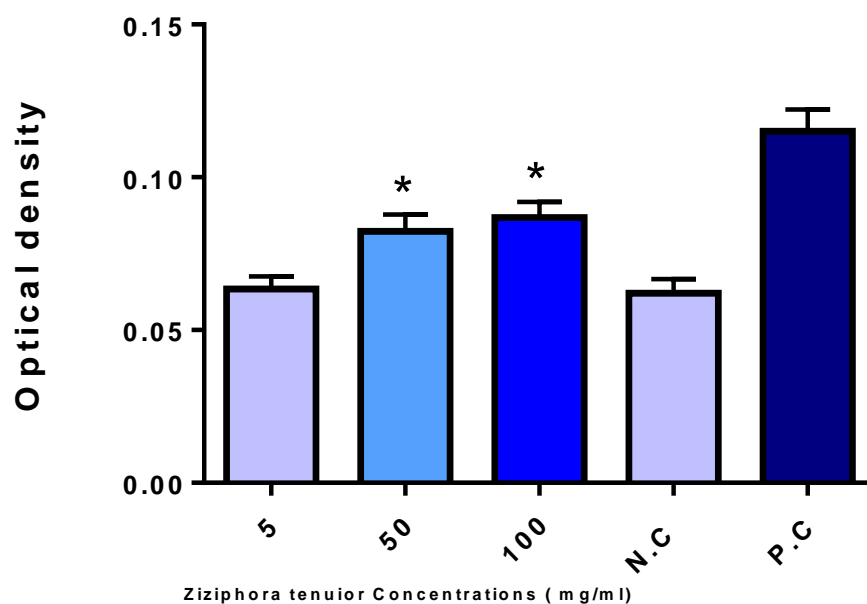
جدول ۴ : اثر آپوتوتیک غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید

درصد آپوتوز	انحراف معیار (SD) \pm میانگین جذب نوری	تعداد تست	غلظت عصاره (mg/ml)
۲/۴۸	0.00408 ± 0.06348	۶	۵
* ۳۲/۸۵	0.00554 ± 0.08231	۶	۵۰
* ۴۰/۲۵	0.00504 ± 0.08683	۶	۱۰۰
۱	0.00469 ± 0.06200	۶	N.C ¹
۱۰۰	0.00719 ± 0.11500	۶	P.C ²

1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

2- Positive control (Available in kit)

* Compared with negative control (p<0.05)



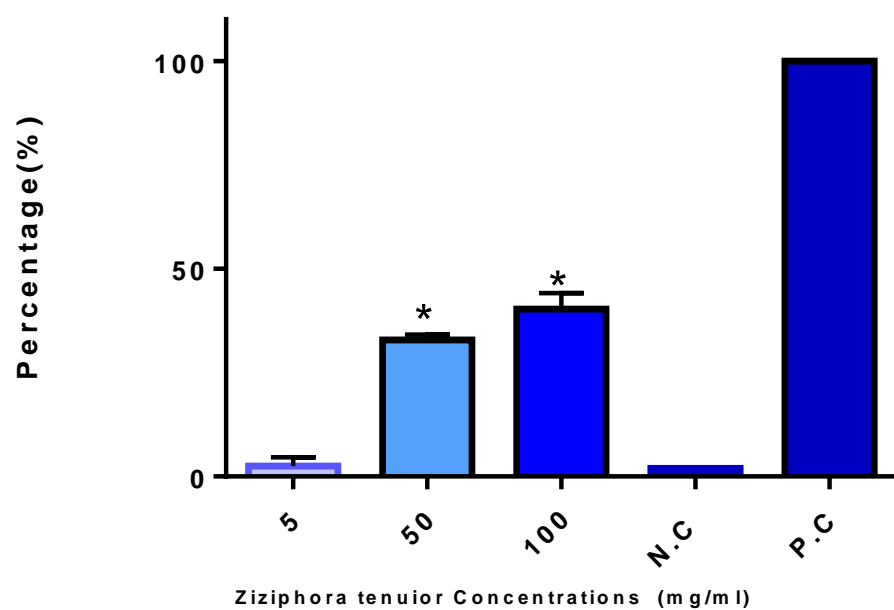
N.C :Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

P.C :Positive control (Available in kit)

* : Compared with negative control ($p < 0.05$)

نمودار ۱ : اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه کاکوتی برروی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بر اساس میزان جذب نوری نمونه ها در

مقایسه با کنترل منفی



N.C :Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

P.C :Positive control (Available in kit)

* : Compared with negative control ($p < 0.05$)

نمودار ۲: اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه کاکوتی برروی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در مقایسه با کنترل منفی بر حسب

درصد

در بررسی اثر رقت های مختلف گیاه کاکوتی (۵ ، ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml) در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ از پروتواسکولکس های تحت تاثیر عصاره مذکور ، مشخص گردید که فعالیت کاسپاز ۳ در تمام غلظت های مورد استفاده از گیاه، افزایش یافت که این افزایش فقط در غلظت های ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ به ترتیب با ۲۹/۹۹ و ۳۶/۰۱ درصد معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$) (جدول شماره ۶).

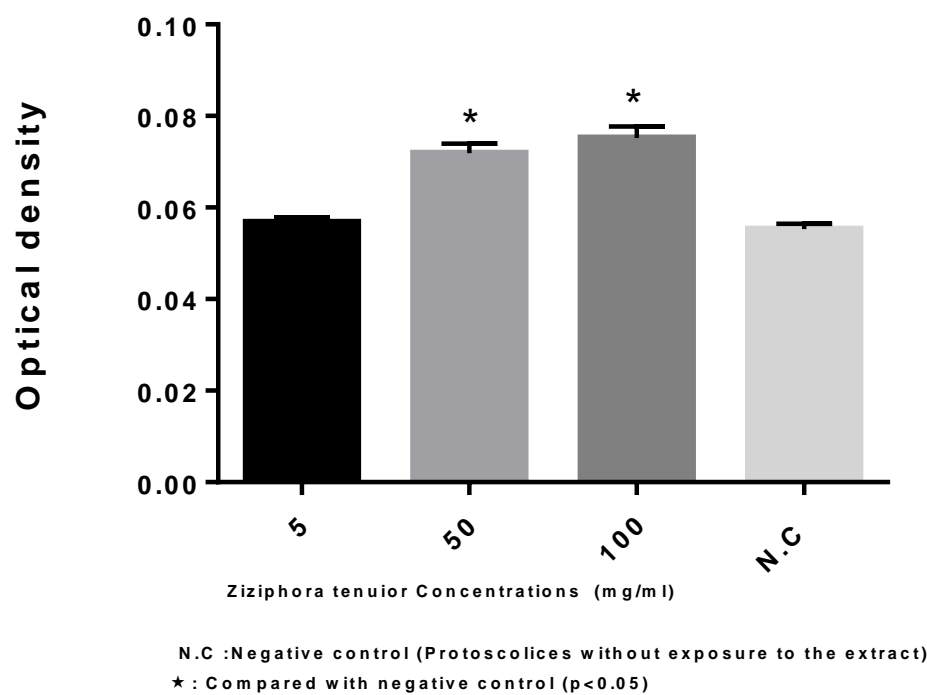
همچنین نمودار های شماره ۳ و ۴ افزایش معنی دار میانگین جذب نوری و افزایش درصد فعالیت کاسپاز ۳ در پروتواسکولکس های مواجه شده با رقت های مذکور (۵۰ mg/ml و ۱۰۰) از عصاره کاکوتی را تایید می کند ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۵: اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳

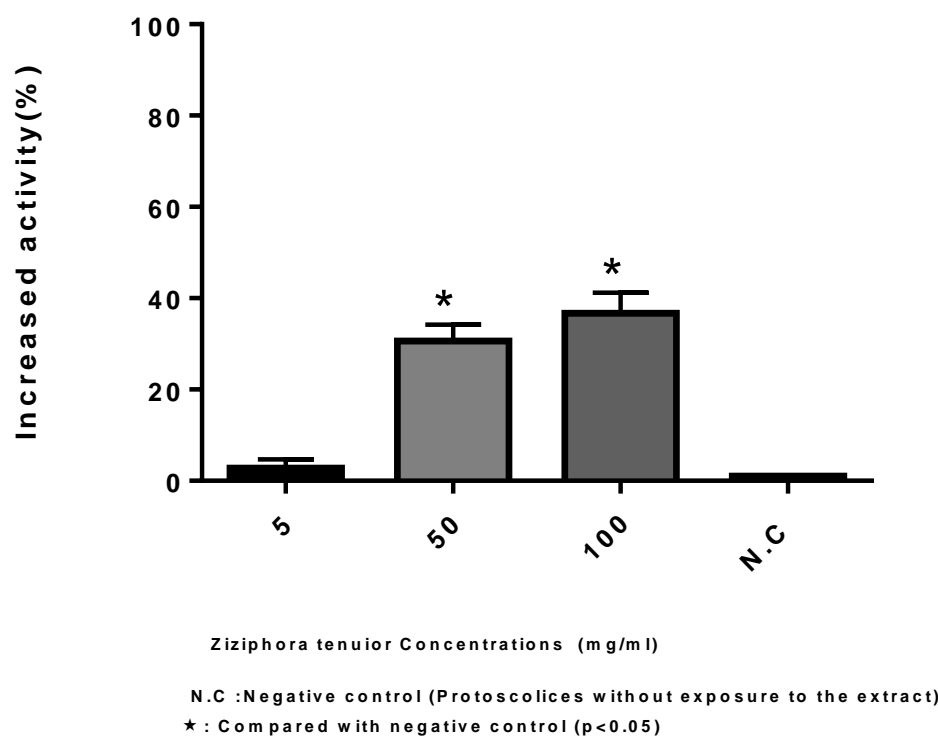
غلظت عصاره (mg/ml)	تعداد تست	انحراف معیار (SD) \pm میانگین جذب نوری	درصد افزایش فعالیت کاسپاز ۳
۵	۶	0.0565 ± 0.0100	۲/۷۶
۵۰	۶	0.07186 ± 0.0212	۲۹/۹۹*
۱۰۰	۶	0.07518 ± 0.0255	۳۶/۰۱*
N.C ¹	۶	0.0553 ± 0.0117	۱

1- Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

* Compared with negative control (p<0.05)



نمودار ۳: اثر عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر حسب جذب نوری



نمودار ۴: اثر عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر حسب درصد

فعالیت کاسپاز ۹ در اثر تاثیر غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها، باز افزایش داشت که این اثر، فقط در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml و در مقایسه با کنترل منفی، به ترتیب با ۱۵/۲۳ و ۴۵/۳۱ درصد، معنی دار بود ($P < 0.05$) (جدول ۷).

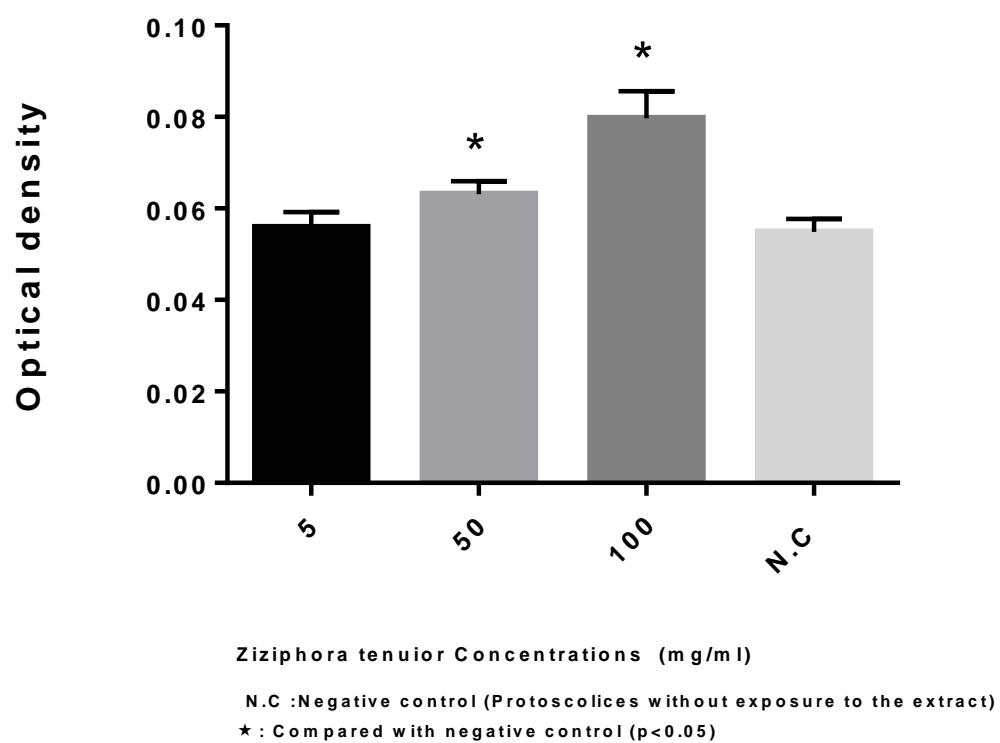
نمودار های شماره ۶ و ۷ نیز نشان می دهد که افزایش جذب نوری و افزایش درصد فعالیت کاسپاز ۹ در پروتواسکولکس ها ی مواجه شده با عصاره گیاه کاکوتی، فقط در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml معنی دار بود ($P < 0.05$).

جدول ۶: اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹.

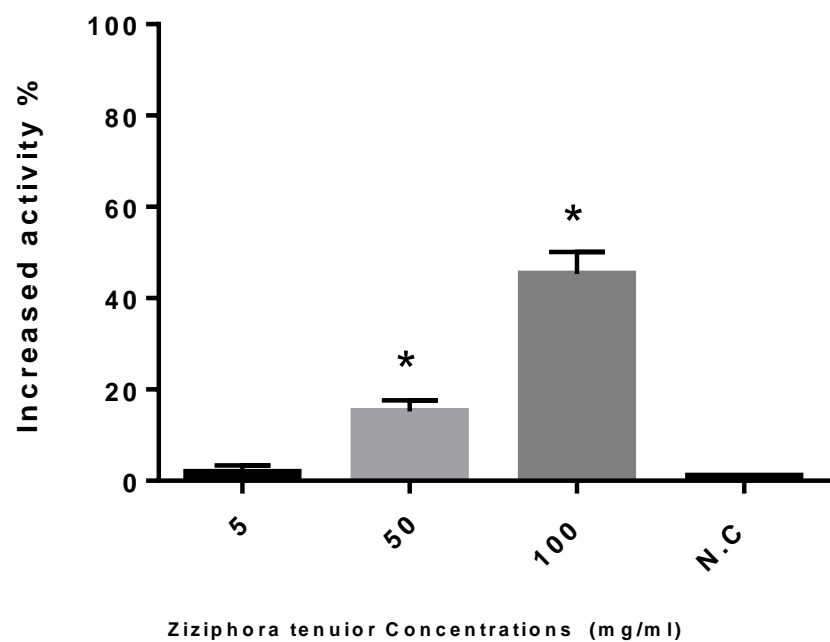
درصد افزایش فعالیت کاسپاز ۹	انحراف معیار (SD) \pm میانگین جذب نوری	تعداد تست	غلظت عصاره (mg/ml)
۱/۸۹	0.00333 ± 0.0558	۶	۵
۱۵/۲۳ *	0.00280 ± 0.06315	۶	۵۰
۴۵/۳۱ *	0.00585 ± 0.07973	۶	۱۰۰
۱	0.00287 ± 0.0548	۶	N.C ¹

1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

* Compared with negative control (p<0.05)



نمودار ۵: اثر عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بر حسب جذب نوری



N.C :Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

* : Compared with negative control ($p < 0.05$)

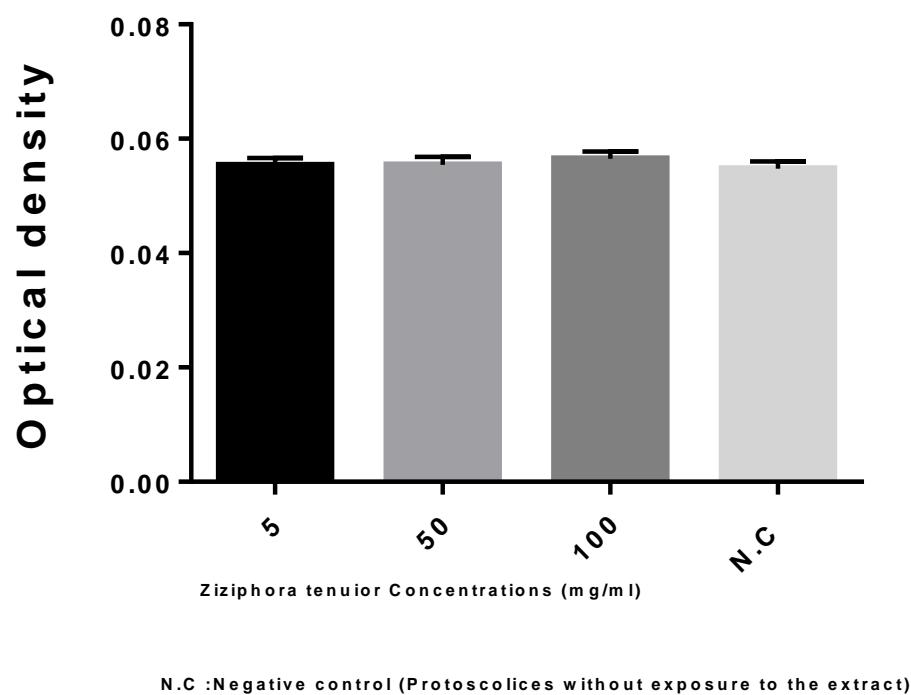
نمودار ۶: اثر عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بر حسب درصد

در بررسی اثر رقت های مختلف گیاه کاکوتی (۵ mg/ml، ۵۰ و ۱۰۰) بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، برای بررسی افزایش فعالیت کاسپاز ۸، هیچکدام از غلظت های مذکور ، افزایش قابل ملاحظه ای در فعالیت کاسپاز ۸ ایجاد نکردند (جدول ۸) ($P=0/6331$). این وضعیت همچنین در برحسب تغییرات جذب نوری و تغییر درصد فعالیت کاسپاز ۸ به ترتیب در نمودار های شماره ۸ و ۹ نشان داده شده است.

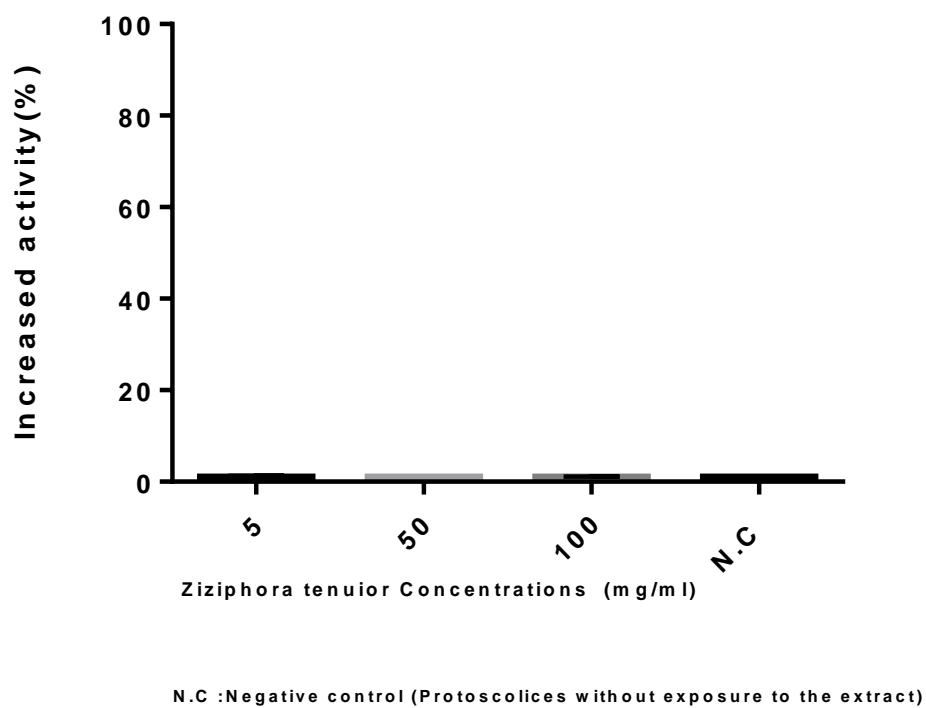
جدول ۷: اثر عصاره گیاه کاکوتی برروی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸

درصد افزایش فعالیت کاسپاز ۸	انحراف معیار (SD) \pm میانگین جذب نوری	تعداد تست	غلظت عصاره (mg/ml)
۱/۰۶	$0/00124 \pm 0/0553$	۶	۵
۱/۰۴	$0/00141 \pm 0/0554$	۶	۵۰
۱/۰۶	$0/00127 \pm 0/0565$	۶	۱۰۰
۱	$0/00125 \pm 0/0547$	۶	N.C ¹

1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)



نمودار ۷: اثر عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ بر حسب جذب نوری



نمودار ۸: اثر عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ بر حسب درصد

با استفاده از تست Tukey اثر مقایسه ای آپوپتوتیک غلظت های مختلف گیاه کاکوتی (۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰) و همچنین اثر مقایسه ای غلظت های مذکور در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ در پروتواسکولکس های کیست هیداتید مواجه شده با گیاه فوق، مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که جداول شماره ۹ تا ۱۲ نشان می دهند، وقتی اثر هر کدام از غلظت ها در القا آپوپتوزیس و همچنین افزایش فعالیت کاسپاز های مورد مطالعه، از پروتواسکولکس ها مقایسه شد، ۱ تا ۴ گروه همگنی مشاهده شدند که این گروه ها ارتباطشان با همدیگر معنی دار نبوده ولی در ارتباط با گروه های دیگر معنی دار بود.

جدول ۸ : اثر مقایسه ای آپوتوتیک غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید با

استفاده از تست Tukey

غلظت (mg/ml)	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)	
		1	2
Neg.control	6	.062	.082317 .086833
5	6	.063483	
50	6		
100	6		
P-value		.572	.281

جدول ۹ : اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش

فعالیت کاسپاز ۳ با استفاده از تست Tukey

غلظت (mg/ml)	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)			
		1	2	3	4
Neg.control	6	.0553			
5	6	.	056817		
50	6			.071867	
100	6				.075183
P-value		1.000	1.000	1.000	1.000

جدول ۱۰ : اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش

فعالیت کاسپاز ۹، با استفاده از تست Tukey

غلظت (mg/ml)	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)			
		1	2	3	4
Neg.control	6	.0548			
5	6	.	.055883		
50	6			.063150	
100	6				.079733
P-value		1.000	1.000	1.000	1.000

جدول ۱۱ : اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش

فعالیت کاسپاز ۸، با استفاده از تست Tukey

غلظت (mg/ml)	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)
		1
Neg.control	6	.0548
5	6	.055200
50	6	.055215
100	6	.057717
P-value		.117

فصل ششم

بحث

در این مطالعه اثر آپوتوتیک گیاه کاکوتی با غلظت های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ در مدت ۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر گیاه مذکور در رقت ها و شرایط فوق، در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، بررسی گردید. گیاه کاکوتی در تمامی رقت های مورد استفاده دارای اثر آپوتوتیک بر روی پروتواسکولکس ها بود که این اثر در مقایسه با کنترل منفی فقط در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml معنی دار بود ($P < 0.05$). همچنین با افزایش غلظت گیاه، اثر آپوتوتیک نیز افزایش داشت. در بررسی اثر رقت های مختلف گیاه مذکور (۵، ۵۰ و ۱۰۰) در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ از پروتواسکولکس های تحت تاثیر عصاره گیاه کاکوتی، مشخص گردید که فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ در تمام غلظت های مورد استفاده از گیاه، افزایش یافت که این افزایش فقط در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml معنی دار بود ($P < 0.05$). لازم به یادآوری است که در بین کاسپاز های مختلف، افزایش کاسپاز ۳ نسبت به ۹ در غلظت ۵۰ mg/ml بیشتر گزارش گردید، در صورتیکه این مساله در غلظت ۱۰۰ mg/ml بر عکس بود یعنی در غلظت مذکور افزایش کاسپاز ۹ بیشتر از کاسپاز ۳ بود. در بررسی اثر رقت های مختلف گیاه کاکوتی (۵، ۵۰ و ۱۰۰) بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، برای بررسی افزایش فعالیت کاسپاز ۸، هیچکدام از غلظت های مذکور، افزایش قابل ملاحظه ای در فعالیت کاسپاز ۸ ایجاد نکردند.

Chachoyan و همکاران در سال ۱۹۹۶ اثرات ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی و ایمونومدولاتوری اسانس گیاه کاکوتی را بر روی سلول های سرطانی جدا شده از لنفوم غیر هوچکینی و همچنین غدد لنفاوی بیماری مذکور، بررسی کردند و نتیجه گرفتند که اسانس کاکوتی رشد سلولهای بدخیم را تا ۳۲/۶٪ و غدد سرطانی را تا

۴۷/۵٪ کاهش داد که این اثر با غلظت اسانس کاکوتی و مدت زمان اثر آن، ارتباط مستقیم داشت. این محققین با استناد به تغییرات ساختاری در سلول های مورد مطالعه، اثرات مذکور را احتمالاً ناشی از القاء آپوپتوزیس در سلول های سرطانی عنوان نمودند (۱۰۲). در تحقیق حاضر نیز عصاره گیاه کاکوتی باعث القاء آپوپتوزیس در پروتواسکولکس های کیست هیداتید گردید که این اثر در غلظت های بالای کاکوتی بیشتر بود.

در سال ۲۰۱۲ امیری و همکاران، اثر آپوپتوتیک و سیتوتوکسیک اسانس و عصاره گیاه اسطوخودوس (یکی از گیاهان هم خانواده کاکوتی) را روی سلول های سرطانی سرویکس رحم بررسی نمودند. در این تحقیق مشاهده شد که رشد سلول های سرطانی، توسط گیاه مذکور مهار شد و همچنین تجمع DNA در فاز G1 چرخه سلولی، از شواهد آپوپتوز سلول های سرطانی عنوان گردید. در مطالعه مذکور اثر آپوپتوتیک و سیتوتوکسیک اسانس و عصاره گیاه اسطوخودوس را به وجود ترکیباتی مثل تیمول و پولگون نسبت دادند (۱۰۳) در تحقیق حاضر نیز گیاه کاکوتی باعث ایجاد آپوپتوزیس در پروتواسکولکس های کیست هیداتید شد که این اثر احتمالاً می تواند به علت وجود ترکیبات مشابه با عصاره گیاه اسطوخودوس (تیمول و پولگون) در گیاه کاکوتی باشد که این مساله نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

دلیلان و همکاران اثر ضد سرطانی عصاره گیاه اسطوخودوس روی سلول های لنفوسیت جدا شده از بیماران لنفوم هوچکین را مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که گیاه مذکور با LC50 ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر باعث کاهش ویابیلیتی لنفوسیت ها شده و همچنین تکثیر این سلول ها را مهار نمود و همچنین عنوان کردند که آپوپتوزیس می تواند یک مکانیسم مهم در مهار رشد سلول های هوچکین مواجه شده با اسانس گیاه فوق باشد (۱۰۴). در مطالعه ما نیز گیاه کاکوتی از طریق اثر آپوپتوتیک توانست باعث مرگ پروتواسکولکس های کیست هیداتید شود، ولی علیرغم تحقیق مذکور در بررسی ما این اثر در غلظت های مختلف متفاوت و وابسته به دوز بود که این مساله می تواند حاکی از وجود ترکیبات مختلف و متنوع در ۲ گیاه مورد مطالعه باشد.

Banerjee و همکاران نیز در سال ۲۰۱۷، اثر ضد سرطانی عصاره گیاه اسطوخودوس بر روی رده سلول های سرطانی پستان و لنفوسیت های خون محیطی انسان را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که عصاره تغلیظ شده گیاه مذکور، توانایی ایجاد آپوپتوزیس در سلول های هر دو گروه مورد آزمایش را دارد که این اثر (آپوپتوزیس) در سلول های سرطانی بیشتر بود. همچنین فعالیت کاسپاز ۹ به صورت معنی داری افزایش یافت و اثرات آپوپتوتیک ایجاد شده با افزایش غلظت عصاره گیاه مذکور ارتباط مستقیم داشت (۱۰۵). در مطالعه ما نیز گیاه کاکوتی دارای اثر آپوپتوتیک قابل ملاحظه ای بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بود و همچنین فعالیت کاسپاز ۹ را به مقدار معنی داری افزایش داد و این اثرات وابسته به غلظت گیاه کاکوتی بود. بر خلاف افزایش کاسپاز ۹، در مطالعه ما تغییری در فعالیت کاسپاز ۸ مشاهده نگردید که این مساله می تواند به علت تفاوت در فاکتور های فعال کننده کاسپاز ۸ و تفاوت در مکانیسم فعال شدن کاسپاز مذکور باشد.

در مطالعه دیگر که توسط Escobar و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد اثر گیاه *Minthostachys verticillat* (گیاهی معطر از خانواده *Lamiaceae* و هم خانواده کاکوتی) بر روی سلول های ^۱vero، ^۲PBMC و سلول های مغز استخوان موش بررسی گردید، علیرغم وجود ۶۸ درصد پولگون در ترکیبات گیاه مذکور، گیاه یاد شده نتوانست در غلظت های $100-1000 \mu g/ml$ روی سلول های مورد آزمایش، ایجاد آپوپتوز نماید (۱۰۶). بر خلاف تحقیق فوق، در مطالعه ما، گیاه کاکوتی با غلظت های 50 و 100 mg/ml توانست آپوپتوزیس را در پروتواسکولکس های کیست هیداتید فعال نماید که این اختلاف می تواند به علت تفاوت در نوع سلول های مورد آزمایش، شرایط آزمایش و غلظت گیاه باشد.

Abaza و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر عصاره متانولی آویشن (یکی از گیاهان هم خانواده کاکوتی) بر روی سلول های سرطانی روده و پستان انسان را مورد بررسی قرار داده و اثرات ایجاد شده را نشان دهنده توقف چرخه سلولی در فاز S و M مرحله G1 دانستند و آن را تایید کننده شروع آپوپتوزیس قلمداد کردند. محققین

¹- Vero cells are a lineage of cells used in cell cultures

²- Peripheral Blood Mononuclear Cell

مذکور بیان کردند که عصاره گیاه آویشن احتمالا با تنظیم منفی عملکرد مهار کننده های آپوپتوز در سلول، باعث ایجاد آپوپتوز می شود و تمام این اثرات را وابسته به غلظت و زمان اثر عصاره گزارش کردند (۱۰۷). در مطالعه حاضر نیز اثرات آپوپتوتیک عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید و وابسته به غلظت بودن اثر مذکور، می تواند با توجه به هم خانواده بودن این گیاه با گیاه فوق در اثر تنظیم منفی مهار کننده های آپوپتوز می باشد که این مساله نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

Machado و همکاران در سال ۲۰۱۴، اثر ضد لیشمانیایی عصاره آویشن بر روی لیشمانیا اینفانتوم را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که عصاره گیاه مذکور بر روی لیشمانیا، می تواند با ایجاد تغییرات ساختاری از جمله تورم میتوکندری، خارج کردن فسفاتیدیل سرین، از دست دادن پتانسیل غشاء میتوکندری و همچنین توقف چرخه سلولی در فاز G1 و G2، باعث مرگ انگل شود و عنوان نمودند که این اثر می تواند مشابه تغییرات در مکانیسم مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوز) باشد. همچنین در این تحقیق بیان شد که عصاره آویشن بر روی سلول های پستانداران اثر سایتوتوکسیک نداشت (۱۰۸). در تحقیق ما، عصاره گیاه کاکوتی با افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹ توانست باعث مرگ پروتواسکولکس های کیست هیداتید شود. با توجه به هم خانواده بودن این گیاه با گیاه مورد مطالعه فوق، در مطالعه حاضر، ممکن است همراه با افزایش فعالیت کاسپاز ها، تغییرات انجام شده در بررسی فوق، از جمله تغییر میتوکندریایی در مطالعه ما نیز وجود داشته باشد که این مساله ضمن تایید ضمنی آپوپتوز، مستلزم تحقیقات بیشتر در مطالعات آینده می باشد.

در سال ۲۰۰۹ Savini و همکاران اثر عصاره *Origanum vulgare* یا مرزنجوش (یکی از گیاهان هم خانواده کاکوتی) بر روی سلول های سرطانی روده بزرگ انسان را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که عصاره گیاه مذکور می تواند هر دو مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز در سلول های مورد آزمایش را فعال کند که این تغییرات با غلظت عصاره گیاه مذکور و زمان مواجهه، ارتباط مستقیم داشت (۱۰۹). در مطالعه ما نیز عصاره گیاه کاکوتی توانست آپوپتوز در پروتواسکولکس های کیست هیداتید را فعال نماید که این تغییرات وابسته به

غلظت عصاره کاکوتی بود. با توجه به تاثیر آپوتوتیک گیاه فوق (مرزنجوش) در هر دو مسیر داخلی و خارجی در سلول های مورد مطالعه، احتمال تاثیر آپوتوتیک عصاره گیاه ما (کاکوتی) از مسیر خارجی نیز وجود دارد و نیازمند تحقیقات بعدی می باشد.

دوست دار و همکاران، القاء آپوتوزیس، متعاقب تاثیر عصاره گل همیشه بهار، در کارسینوم تجربی کولون موش صحرایی را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که این اثر با میزان عصاره ارتباط مستقیم دارد (۱۱۰). همچنین Jimenez و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که عصاره گل همیشه بهار می تواند در محیط کشت، سلول های سرطانی را به میزان ۷۰ تا ۱۰۰ درصد از طریق آپوتوزیس از بین ببرد و باعث افزایش فعالیت کاسپاز ۳ گردد. این اثرات با افزایش غلظت گیاه ارتباط مستقیم داشت. در تحقیق اخیر توانایی القاء آپوتوز توسط عصاره گل همیشه بهار، به وجود ترکیبات تری ترپن در آن نسبت داده شده است (۱۱۱). در تحقیق ما نیز ایجاد مرگ سلولی همراه با افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹، متعاقب اثر عصاره گیاه کاکوتی، وابسته به غلظت بود و با توجه به اینکه ترپن ها و سزکویی ترپن ها از ترکیبات مهم موجود در عصاره گیاه کاکوتی می باشند، توانایی القاء آپوتوزیس توسط گیاه کاکوتی در مطالعه حاضر را، می توان احتمالا به وجود ترکیبات فوق در گیاه مورد مطالعه نسبت داد.

Senathilake و همکاران در سال ۲۰۱۷، اثر عصاره متانولی برگ، پوست و دانه گیاه *Dipterocarpus zeylanicus* را بر روی انگل *Filaria setaria digitate* مطالعه نمودند و نتیجه گرفتند که عصاره گیاه مذکور باعث آپوتوز انگل در شرایط آزمایشگاهی می گردد و همچنین فعالیت کاسپاز ۳ را نیز به مقدار معنی داری افزایش می دهد. آپوتوزیس ایجاد شده وابسته به غلظت عصاره و زمان مواجهه بود. این محققین اثر آپوتوتیک گیاه فوق را به وجود اسید اولئانولیک از ساپونین های تری ترپن در ترکیب عصاره مذکور مرتبط دانستند (۱۱۲). در مطالعه ما نیز گیاه کاکوتی توانست آپوتوزیس را در پروتواسکولکس های کیست هیداتید ایجاد کند و همچنین کاسپاز ۳ را نیز فعال نماید. با توجه به اینکه ساپونین های تری ترپن، از ترکیبات موجود

در عصاره کاکوتی نیز می باشند، لذا اثر آپوتوتیک گیاه کاکوتی می تواند احتمالا به علت وجود ترکیبات مذکور باشد که البته نیاز به مطالعات تکمیلی و بیشتر دارد. همچنین در مطالعه حاضر نیز همانند بررسی فوق، اثرات آپوتوتیک گیاه وابسته به دوز بود.

Dai و همکاران در سال ۲۰۱۶، اثر ضد سرطانی کارواکرول (یکی از ترکیبات موجود در آویشن و اکثر گیاهان خانواده نعنائیان از جمله کاکوتی) را بر روی سلول های سرطانی اپی تلیال دهان مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که کارواکرول به میزان قابل توجهی مانع تکثیر سلول های توموری شده و با تاثیر روی مهارکننده های کاسپاز ها، باعث فعال شدن کاسپازهای ۳ و ۹ گردید و در نتیجه باعث ایجاد آپوتوزیس در سلول های مذکور شد که تمام این اثرات وابسته به دوز و زمان اثر دارو بود (۱۱۳). همچنین در تحقیقی مشابه که توسط Bhakki و همکاران انجام شد اثر کارواکرول را روی سلول های لوسمی پرو میلو سیتیک و لنفوسیت های T انسانی بررسی نمودند و به نتایج مشابه رسیدند و مشاهده کردند که در سلول های تحت مطالعه، فعالیت کاسپاز ۳ افزایش یافته و آپوتوزیس ایجاد گردیده است (۱۱۴). در مطالعه ما نیز عصاره گیاه کاکوتی که از گیاهان خانواده نعنائیان می باشد باعث ایجاد آپوتوزیس و افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ از پروتواسکولکس های کیست هیداتید گردید و با توجه به وجود مقادیر قابل توجهی از ماده کارواکرول در عصاره کاکوتی، اثر آپوتوتیک گیاه مذکور می تواند احتمالا به علت وجود ترکیب مذکور در عصاره گیاه مورد مطالعه باشد که این مساله با توجه به نوع گیاهان، احتمال وجود ترکیبات مختلف در آنها و اختلاف سلول های مورد مطالعه، نیاز به مطالعات بیشتری دارد. ضمنا در مطالعه محققین فوق نیز مشابه مطالعه ما، اثر آپوتوتیک گیاهان مذکور وابسته به دوز بود.

رازی و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر آپوتوتیک پولگون (یکی از ترکیبات مهم موجود در گیاه کاکوتی) بر روی بافت تخمدان موش را بررسی نمودند. در این تحقیق موش ها با مقادیر ۲۵، ۵۰، و ۱۰۰ mg/kg پولگون تیمار شدند. پس از بررسی بافت تخمدان، نتیجه حاصل حاکی از ایجاد آپوتوزیس روی بافت تخمدانی بود و این اثر

متناسب با افزایش غلظت پولگون بود (۱۱۵). در بررسی ما نیز ایجاد آپوپتوزیس روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید وابسته به غلظت گیاه بود و با توجه به وجود مقادیر قابل توجهی از پولگون در ترکیب عصاره گیاه کاکوتی، احتمال اثر آپوپتوتیک گیاه مذکور بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در مطالعه حاضر را توجه می کند که این مساله مطالعات بیشتر و تکمیلی را طلب می کند.

Chauhan و همکاران در سال ۲۰۱۷، اثر تیمول روی سرطان کولون را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که تیمول با فعال کردن کاسپاز های ۸، ۹ و مهار استرس اکسیداتیو، باعث فعال کردن مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) می شود (۱۱۶). در تحقیقی مشابه که توسط Li و همکاران انجام شد اثر تیمول بر روی رشد سلول های سرطانی مثانه بررسی گردید و نتیجه گرفته شد که ایجاد آپوپتوزیس و افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹، وابسته به دوز دارو و زمان انکوباسیون است (۱۱۷). در تحقیق ما نیز عصاره گیاه کاکوتی توانست باعث القاء آپوپتوزیس در پروتواسکولکس های کیست هیداتید شود و فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹ را افزایش دهد اما در فعالیت کاسپاز ۸ افزایش قابل ملاحظه ای ایجاد نکرد. با توجه به اینکه تیمول یکی از ترکیبات مهم عصاره گیاه کاکوتی محسوب می شود، انتظار می رفت فعالیت کاسپاز ۸ نیز در اثر عصاره گیاه مذکور افزایش یابد اما عدم افزایش کاسپاز مذکور می تواند به علت شرایط برون تنی در مطالعه ما باشد. چنانکه کاسپاز ۸ معمولاً جهت فعال شدن، به واسطه های ایمنی بدن نیاز دارد.

نصیرزاده و همکاران در سال ۱۳۹۴، اثر سیلی بینین (یک فلاونوئید گیاهی) در القاء آپوپتوزیس و افزایش فعالیت کاسپاز ۹، در سلول های اپیتلیال بند ناف در غلظت های ۴۰۰-۱۰۰ میکرومولار و زمانهای مختلف را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که بیشترین آپوپتوزیس توسط ترکیب فوق در بالاترین غلظت ایجاد شد، ولی بیشترین فعالیت کاسپاز ۹ در غلظت ۱۰۰ میکرومولار بدست آمد (۱۱۸). در مطالعه ما نیز بیشترین درصد آپوپتوزیس در بالاترین غلظت گیاه کاکوتی ایجاد گردید، در صورتیکه بیشترین فعالیت کاسپاز ۹ نیز بر خلاف مطالعه فوق در بالاترین غلظت مشاهده شد که این تفاوت تاثیر در افزایش فعالیت کاسپازی احتمالا می تواند

به علت اختلاف در نوع گیاهان، نوع سلول های مورد مطالعه و غلظت ترکیبات مختلف آن از جمله فلاونوئیدها باشد.

علاوه بر تحقیقات فوق، بررسی های دیگری در مورد مکانیسم های مختلف آپوپتوزیس بر روی پروتواسکولکس ها صورت گرفته است، چنانکه Pensel و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر اسانس گیاهان آویشن باغی و مرزنجوش (از گیاهان هم خانواده کاکوتی) بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که گیاهان مذکور بعد از ۱۶ ساعت می توانند در پروتواسکولکس های کیست هیداتید آپوپتوزیس ایجاد نمایند. در این تحقیق مقدار تیمول موجود در اسانس گیاهان را به میزان $10 \mu g/ml$ تنظیم نمودند و هم زمان با اسانس گیاهان، اثر تیمول را نیز به تنهایی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که آپوپتوزیس ناشی از تیمول در مدت ۸ ساعت ایجاد شد (۱۲۰). در تحقیق حاضر نیز عمل آپوپتوزیس بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید انجام شد و مدت زمان لازم برای این مساله در مقایسه با بررسی فوق خیلی کوتاه تر (۴ ساعت) بود که این تفاوت احتمالا می تواند به دلیل اختلاف در مقدار تیمول موجود در عصاره گیاه کاکوتی باشد که این مساله نیاز به بررسی بیشتر دارد. همچنین Hu و همکاران در سال ۲۰۱۱ تاثیر H_2O_2 و دگزامتازون در آپوپتوزیس پروتواسکولکس ها را مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق مذکور پروتواسکولکس های کیست هیداتید در مجاورت 1 mmol/L ، H_2O_2 و 5 mmol/L دگزامتازون به مدت ۸ ساعت انکوبه شدند و سپس ایجاد آپوپتوزیس را به وسیله میکروسکوپ الکترونی و روش $TUNEL^1$ بررسی نموده و افزایش فعالیت کاسپاز های ۱ و ۳ را نیز با روش های ایمونوهیستوشیمی و رنگ سنجی مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق فوق نشان داده شد که سلول های تیمار شده با H_2O_2 و دگزامتازون با غلظت های مذکور می توانند باعث ایجاد آپوپتوزیس در پروتواسکولکس های کیست هیداتید شده و فعالیت کاسپاز های ۱ و ۳ را نیز افزایش دهند که فقط افزایش کاسپاز ۳ معنی دار

³- Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling

بود (۱۲). در تحقیقی مشابه در سال ۲۰۱۲ نیز، آپوپتوزیس حاصل از دارو درمانی ناشی از پرازی کوانتل بر علیه اکینوکوکوس گرانولوزوس توسط De و همکارانش گزارش گردید. در تحقیق مذکور فعالیت کاسپاز ۳ پس از درمان با داروی مذکور به میزان معنی داری افزایش یافت و قطعات نوکلئوزوم و DNA به عنوان شاخص آپوپتوزیس، مورد شناسایی قرار گرفتند (۱۱۹). در تحقیق ما نیز عصاره گیاه کاکوتی همسو با تحقیقات فوق، توانست با افزایش معنی دار کاسپاز ۳ در پروتواسکولکس های کیست هیداتید، ایجاد آپوپتوز نماید.

همچنین در تحقیقات دیگر نیز اثر مواد مختلف از جمله ATP و دگزامتازون بعنوان القاء کننده آپوپتوزیس در پروتواسکولکس ها گزارش شده (۱۲۱) و نشان داده شده که آپوپتوزیس در غیر بارور بودن کیست های هیداتید نقش داشته و بیان مولکول های القاء کننده آپوپتوزیس در سطح لایه ژرمینال کیست های نابارور، نسبت به کیست های بارور و بافت سالم در سطح بالاتری قرار دارد (۸۴). لذا با توجه به اثر آپوپتوتیک مواد پروتواسکولیسیدال شیمیایی، عصاره های گیاهی و ترکیبات مختلف گیاهان دارویی که توسط محققین مختلف گزارش شده و همچنین اثر اسکولیسیدالی گیاه مورد مطالعه (کاکوتی) در تحقیقات قبلی، اثر آپوپتوتیک گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید قابل توجه است که این مساله می تواند زمینه ساز تحقیقات بیشتر در آینده باشد.

نتیجه گیری

عصاره گیاه کاکوتی در تمامی غلظت های مورد استفاده بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، توانست همراه با افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹ باعث آپوپتوزیس در پروتواسکولکس ها شود که اثرات مذکور فقط در غلظت های بالاتر (۵۰ و ۱۰۰ mg/ml) معنی دار بود.

پیشنهادهات

با توجه به اثر آپوتوتیک غلظت های بالای عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید و همچنین تاثیر آن در افزایش کاسپاز های ۳ و ۹، انجام تحقیقات ذیل در آینده پیشنهاد می شود.

۱- بررسی اثر آپوتوتیک عصاره گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط درون تنی.

۲- بررسی اثر آپوتوتیک فراکشن های مختلف گیاه کاکوتی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط برون تنی و درون تنی.

۳- بررسی اثر آپوتوتیک ترکیبات موجود در گیاه کاکوتی از جمله پولگون، تیمول و کارواکرول بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید.

۴- بررسی اثر آپوتوتیک عصاره گیاه کاکوتی و فراکشن های آن بر روی ژنوتیپ های مختلف پروتواسکولکس های کیست هیداتید.

فصل هفتم

منابع

1. Pakala T, Molina M, Wu GY. Hepatic echinococcal cysts: A review. J Clin Transl Hepatol 2016; 4(1):39-46.
2. Rausch R, d'alessandro A. The epidemiology of echinococcosis caused by *Echinococcus oligarthrus* and *E. vogeli* in the Cestode Zoonoses. Emerg Infect Dis 2002; 341:107-25.
3. Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. Clin Microbiol Rev 2004;17(1): 107-35.
4. Thompson RA, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. Trends Parasitol 2002;18(10): 452-7.
5. Adas G, Arikan S, Kemik O, Oner A, Sahip N, Karatepe O. Use of albendazole sulfoxide, albendazole sulfone, and combined solutions as scolical agents on hydatid cysts (in vitro study). World J Gastroenterol 2009; 15(1): 112-6.
6. Topcu O, Aydin C, Arici S, Duman M, Koyuncu A, Sen M. The effects of various scolical agents on the hepatopancreatic biliary system. Visc Med 2006; 22(3): 185-90.
7. McManus DP, Gray DJ, Zhang W, Yang Y. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis. Bmj 2012; 344(7861): 39-44.
8. Moazeni M, Nazer A. In vitro lethal effect of *Zingiber officinale* R. on protoscolices of hydatid cyst from sheep liver. Microbiol Res 2011; 2(25): 91-4.
9. Formigli L, Conti A, Lippi D. "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. Minerva Med 2004; 95(2): 159-64.
10. Kanan JH, Chain BM. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. Immunology 2006; 118(2): 271-8.

11. Verbrugge I, De Vries E, Tait S, Wissink E, Walczak H, Verheij M, Borst J. Ionizing radiation modulates the TRAIL death-inducing signaling complex, allowing bypass of the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene* 2008; 27(5): 574-84.
12. Hu H, Kang J, Chen R, Mamuti W, Wu G, Yuan W. Drug-induced apoptosis of *Echinococcus granulosus* protoscolices. *Parasitol Res* 2011; 109(2): 453-9.
13. Shahnazi M, Azadmehr A, Andalibian A, Hajiaghaee R, Saraei M, Alipour M. Protoscolicidal and immunomodulatory activity of *Ziziphora tenuior* extract and its fractions. *Asian Pac J Trop Dis* 2016; 9(11): 1062-8.
14. Rokni M. Echinococcosis/hydatidosis in Iran. *Iran J Parasitol* 2009; 4(2): 1-16.
15. Singh BB, Sharma JK, Tuli A, Sharma R, Bal MS, Aulakh RS, Gill, JPS. Prevalence and Morphological Characterisation of *Echinococcus Granulosus* from North India. *J Parasit Dis* 2014;38(1): 36-40.
16. Nunnari G , Pinzone MR, Gruttadauria S, Celesia BM, Madeddu G, Malaguarnera G, Pavone P, Cacopardo B, Cappellani A. Hepatic echinococcosis: clinical and therapeutic aspects. *World J Gastroenterol* 2012; 18(13): 1448-58.
17. Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int J Parasitol* 2013; 43(12): 1017-29.
18. Muller R, Wakelin D. Worms and human disease: Second edition. CABI Publishing, a division of CAB International: Wallingford, Oxon-New York, 2002. 300 pages.
19. Mandal S, Mandal MD. Human cystic echinococcosis: epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Asian Pac J Trop Med* 2012; 5(4): 253-60.
۲۰. مهبد ع، رضائیان م. انگل شناسی پزشکی مارکل، انتشارات تیمورزاده . سال ۱۳۸۵: ۲۲۴-۲۲۰.
21. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis* 2009; 13: 125-33.
22. Neva FA, Brown HW. Basic clinical parasitology. Appleton & Lange. Inc. Norwalk 1994:57-71.

۲۳. محمود زاده پورناکی ع. تهیه و تخلیص و ارزشیابی آنتی ژن اختصاصی کیست هیداتید و کاربرد آن در تستهای سرمی. پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری انگل شناسی. دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ۷۳-۱۳۷۲.

24. Rahdar M, Maraghi S, Rafei A, Razijalali M. Comparison of some electrolytes in hydatid cyst fluid and serum of liver hydatidosis of sheep. Jundishapur J Microbiol 2008; 1(1): 10-4.

25. Macpherson CN, Craig PS. Dogs and cestode zoonoses. Dogs, zoonoses and public health. Publication Year 2013; Issue: Ed.2, Page: 277 pp.

26. Dalimi A, Motamedi Gh, Hosseini M, Mohammadian B. Echinococcosis /hydatidosis in western Iran. Vet Parasitol 2002; 105: 161- 71.

27. Torgerson P, Budke C. Echinococcosis an international public health challenge. Res Vet Sci 2003; 74(3): 191-202.

28. WHO Informal Working Group on Echinococcosis (IWGE). International classification of ultrasound images in cystic echinococcosis for application in clinical and field epidemiological settings. Acta Trop 2003; 85(2): 253-61.

29. Torgerson PR, Macpherson CN. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. Vet Parasitol 2011; 182(1): 79-95.

30. Jenkins D, Romig T, Thompson R. Emergence/re-emergence of Echinococcus spp. a global update. Int J Parasitol 2005; 35(11): 1205-19.

31. Sadjjadi SM. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. Parasitol Int 2006; 55: S197- S202.

32. Cardona GA, Carmena D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. Vet Parasitol 2013; 192(1): 10-32.

33. Ziaei H, Fakhar M, Armat S. Epidemiological aspects of cystic echinococcosis in slaughtered herbivores in Sari abattoir, North of Iran. J Parasit Dis 2011; 35(2): 215-8.

۳۴. حمیدرضا ت, علیرضا ب, جنیدی جعفری ن, اپیدمیولوژی بیماری هیداتیدوز در ایران طی سال های ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۵. نشریه بیماریهای عفونی و گرمسیری ایران : ۱۳۸۷ , دوره ۱۳ , شماره ۴۲ ; ۶۷-۷۱ .

35. Mansoorlakooraj H, Saadati D, Javadi R, Heydari S, Torki E, Gholami H, Mazaheri Nezhad R. A survey on hydatidosis in livestock in Northern Iran based on data collected from slaughterhouses from 2004 to 2008. *Vet Parasitol* 2011; 182(2): 364-7.
 36. Rokni M. The present status of human helminthic diseases in Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 2008; 102(4): 283-95.
 37. Nourjah N, Sahba G, Baniardalani M, Chavshin A. Study of 4850 operated hydatidosis cases in Iran. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004; 35:218-22.
 38. Sadjjadi SM, Ardehali S, Noman-Pour B, Kumar V, Izadpanah A. Diagnosis of cystic echinococcosis: ultrasound imaging or countercurrent immunoelectrophoresis? *East Mediterr Health J* 2001; 7(6): 907-11.
 39. Arbabi M, Masoud J, Asl AD, Sajadi M. Seroepidemiologic prevalence of Hydatid cyst in Hamadan 1991. *Feyz J* 1998; (2)2: 43-50.
 40. Zariffard M, Abshar N, Akhavizadegan M, Motamedi G. Seroepidemiological survey of human hydatidosis in western parts of Iran. *Archives of Razi Institute* 1999; 50: 71-5.
 41. Saberi-Firouzi M, Kaffashian F, Hayati E, Ghaderi A, Keshavarz H, Arshadi S, Sotudehmaram M, Massarrat M, Ghalambor M, Prevalence of hydatidosis in nomadic tribes of southern Iran. *Med J Islam Repub Iran* 1998; 12(2): 113-8.
 42. Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski ZS. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. *Acta Trop* 2001:20-71.
۴۳. صائبی، ا. بیماری های انگلی در ایران، جلد دوم، ویرایش دوم، انتشارات آبیژ. تهران. ایران ۱۳۹۳.
44. Filippou D, Tselepis D, Filippou G, Papadopoulos V. Advances in liver echinococcosis: diagnosis and treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5(2): 152-9.
 ۴۵. جمشیدی م، محرز م، زنگنه م، جمشیدی ماکینانی ع. ارزیابی درمان دارویی کیست هیداتیک با آلبندازول و پرازی کوانتل. فصلنامه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. دوره ۱۷. شماره ۳. پائیز ۸۶: ۱۶۰ - ۱۵۷.
 46. Jenkins D. WHO/OIE manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Pergamon 2001: 1717-8.

47. Zhang W, Wen H, Li J, Lin R, McManus DP. Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. *Clin Dev Immunol* 2011; 10: 6679-85.
48. Sarkari B, Sadjjadi S, Beheshtian M, Aghaee M, Sedaghat F. Human cystic echinococcosis in Yasuj district in Southwest of Iran: an epidemiological study of seroprevalence and surgical cases over a ten-year period. *Zoonoses Public Health* 2010; 57(2): 146-50.
49. Sadjjadi SM, Abidi H, Sarkari B, Izadpanah A, Kazemian S. Evaluation of enzyme linked immunosorbent assay, utilizing native antigen B for serodiagnosis of human hydatidosis. *Iran J Immunol* 2007; 4(3): 167-72.
50. Sarkari B, Sadjjadi S, Abidi H, Izadpanah A, Kazemian S, Rafati A. Application of western blotting using native antigen B for serodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Iran J Parasitol* 2007; 2(3): 7-12.
۵۱. جعفری ا. ارزیابی میزان باروری کیست هیداتید و ویبیلیتی پروتواسکولکس ها. پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری پزشکی عمومی. دانشکده پزشکی شهید بابائی قزوین، ۸۸- ۱۳۸۷.
52. da Silva AM. Human echinococcosis: a neglected disease. *Gastroenterol Res Pract* 2010; 60(4): 543-52.
53. Park K-H, Jung S-I, Jang HC, Shin J-H. First successful puncture, aspiration, injection, and re-aspiration of hydatid cyst in the liver presenting with anaphylactic shock in Korea. *Yonsei Med J* 2009; 50(5): 717-20.
54. Fisichella PM, Donaldson K, Helton WS. Hepatic and splenic hydatidosis managed with Percutaneous Aspiration, Injection, and Reaspiration (PAIR) of the hepatic cyst and laparoscopic splenectomy. *J Gastrointest Surg* 2008; 12(9): 1615-7.
55. Siracusano A, Teggi A, Ortona E. Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009;38(12): 1371-76.
56. Siracusano A, Delunardo F, Teggi A, Ortona E. Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story. *Clin Dev Immunol* 2011;2012(10): 552-66.
57. Zhang W, Ross AG, McManus DP. Mechanisms of immunity in hydatid disease: implications for vaccine development. *J. Immunol* 2008; 181(10): 6679-85.

58. Siracusano A, Margutti P, Delunardo F, Profumo E, Riganò R, Buttari B, Teggi A, Ortona E. Molecular cross-talk in host–parasite relationships: The intriguing immunomodulatory role of *Echinococcus* antigen B in cystic echinococcosis. *Int J Parasitol* 2008; 38(12): 1371-6.
59. Arend A, Zaha A, Ayala F, Haag K. The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. *Exp Parasitol* 2004; 108(1): 76-80.
60. Chemale G, Haag KL, Ferreira HB, Zaha A. *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 116(2): 233-7.
61. Fernández V, Ferreira HB, Fernández C, Zaha A, Nieto A. Molecular characterisation of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 77(2): 247-50.
62. Haag K, Alves-Junior L, Zaha A, Ayala F. Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. *Gene* 2004; 333: 157-67.
63. Rigano R, Buttari B, Profumo E, Ortona E, Delunardo F, Margutti P, Mattei V, Teggi A, Sorice M, Siracusano A. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun* 2007; 75(4): 1667-78.
64. Ortona E, Margutti P, Delunardo F, Vaccari S, Rigano R, Profumo E, Buttari B, Teggi A, Siracusano A. Molecular and immunological characterization of the C-terminal region of a new *Echinococcus granulosus* heat shock protein 70. *Parasite Immunol* 2003; 25(3): 119-26.
65. Bauder B, Auer H, Schilcher F, Gabler C, Romig T, Bilger B, Aspöck H. Experimental investigations on the B and T cell immune response in primary alveolar echinococcosis. *Parasite Immunol* 1999; 21(8): 409-22.
66. Vuitton DA. The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or of the parasite? *Acta Trop* 2003; 85(2): 119-32.
67. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; 92(1): 57-70.

68. Cliffe LJ, Potten CS, Booth CE, Grecis RK. An increase in epithelial cell apoptosis is associated with chronic intestinal nematode infection. *Infect Immun* 2007; 75(4): 1556-64.
69. Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci* 2001; 69(25-26): 2957-64.
70. Israels E, Israels L. The cell cycle. *Transl Oncol* 2000;5(6): 510-13.
71. Hashemi M, Ghavami S. Methods of studying the apoptosis. *J Rafsanjan Univ Med Sci Health Serv* 2008; 7(1): 71-8.
72. Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature Immunol* 2009; 10(4): 348-55.
73. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001; 11(12): 526-34.
74. Hashemi M, Karami-Tehrani F, Ghavami S. Cytotoxicity effect of cladribine on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Iran Biomed J* 2004; 8(1): 7-12.
75. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68(1): 383-424.
76. Hashemi M, Karami-Tehrani F, Farzami B. Caspase dependent apoptosis induced by cladribine in the estrogen receptor negative breast cancer cell line, MDA-MB468. *J Sci I R Iran* 2003;14(4): 303-10.
77. Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. *J Qazvin Univ Med Sci* 2013; 17(3): 48-57.
78. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. *Lancet (London, England)* 2003; 362(9392): 1295-304.
79. Adas G, Arian S, Kemik O, Oner A, Sahip N, Karatepe O. Use of albendazole sulfoxide, albendazole sulfone, and combined solutions as scolicidal agents on hydatid cysts (in vitro study). *World J Gastroenterol* 2009; 15(1): 112-6.
80. Puryan K, Karadayi K, Topcu O, Canbay E, Sumer Z, Turan M, Karayalcin K, Sen M. Chlorhexidine gluconate: an ideal scolicidal agent in the treatment of intraperitoneal hydatidosis? *World J Surg* 2005; 29(2): 227-30.

81. Zibaei M, Sarlak A, Delfan B, Ezatpour B, Azargoon A. Scolicidal effects of *Olea europaea* and *Satureja khuzestanica* extracts on protoscolices of hydatid cysts. *Korean J Parasitol* 2012; 50(1): 53-6.
82. Moazeni M, Saharkhiz MJ, Hosseini AA. In vitro lethal effect of 82. ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) essential oil on hydatid cyst protoscolices. *Vet Parasitol* 2012; 187(1): 203-8.
83. Rouhani S, Salehi N, Kamalinejad M, Zayeri F. Efficacy of *Berberis vulgaris* aqueous extract on viability of *Echinococcus granulosus* protoscolices. *J Invest Surg* 2013; 26(6): 347-51.
84. Paredes R, Jimenez V, Cabrera G, Iragüen D, Galanti N. Apoptosis as a possible mechanism of infertility in *Echinococcus granulosus* hydatid cysts. *J Cell Biochem* 2007; 100(5): 1200-9.
85. Weil M, Jacobson M, Coles H, Davies T, Gardner R, Raff K, Raff MC. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* 1996; 133(5): 1053-9.
86. Zangger H, Mottram J, Fasel N. Cell death in Leishmania induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* 2002; 9(10):1126-39.
87. Huang X, Halicka HD, Traganos F, Tanaka T, Kurose A, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif* 2005; 38(4): 223-43.
88. Carneiro-Santos P, Martins-Filho O, Alves-Oliveira LF, Silveira A, Coura-Filho P, Viana IR, Wilson A, Correa-Oliveira R. Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human Schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol* 2000; 22(6): 267-77.
89. Tato P, Fernandez A, Solano S, Borgonio V, Garrido E, Sepulveda J, Molinari JL. A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol Res* 2004; 92(3): 197-204.

۹۰. فرزانه ن، زهرا ت. مقایسه ترکیب های شیمیایی اسانس، غلظت عناصر موجود در خاک و خواص ضدباکتریایی گیاه کاکوتی (*Ziziphora tenuior* L.) در دو منطقه ایران. دو ماهنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران : تابستان ۱۳۹۰، دوره ۲۷، شماره ۲ (پیاپی ۵۲)؛ ۲۴۸ - ۲۳۹.

۹۱. ایمانی ی، رزبان حقیقی ا، سفیدکن ف، نادری م. بررسی کموتیپ‌های مختلف گونه *Thymus pubescens* Boiss.et Kotschy ex Celak براساس ترکیب‌های اسانس در استان آذربایجان شرقی. دو ماهنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۱۵؛ ۳۱(۳): ۴۰۵-۳۹۶.

۹۲. آقایی م، حسنی ع، درویش‌زاده ر. بررسی تنوع فنوتیپی میزان فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی توده‌های بومی ریحان (*Ocimum basilicum* L) ایران. دو ماهنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۱۴؛ ۳۰(۲): ۹۱-۲۸۳.

93. Batooli H, Akhbari M, Hosseinizadeh SMJ. Effect of different distillation methods on quantity and quality of essential oil of two *Ziziphora* L. species. Int J Herb Med 2012; 3(3): 135-46.

94. Tabatabaee F, Mortazavi A, Koocheki A, Afsharian S, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial properties of plant extracts of *Thymus vulgaris* L., *Ziziphora tenuior* L. and *Mentha Spicata* L., against important foodborne pathogens in vitro. Scientific Int J Microbiol 2013; 2(2): 23-30.

95. Shahla SN. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oil against some pathogenic bacteria. Afr J Microbiol Res 2012; 6(7): 1504-8.

۹۶. مریم ش، انوشه ش، آقابیگی م. شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس کاکوتی و بررسی اثر ضد میکروبی آن بر روی مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس. مجله علوم غذایی و تغذیه. ۱۲؛ ۹(۳): ۱۰۸-۱۰۱.

۹۷. نائینی ع، ناصری م، کمال نژاد م، خوش زبان ف، رجبیان ط، اسماعیل زاده نامی ح، منصور ی ص، زاویه د. بررسی اثرات اسانس ها و عصاره های ۵۰ گیاه دارویی ایران روی سویه ای استاندارد کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه گیاهان دارویی. سال دهم، دوره دوم. بهار ۱۳۹۰؛ ۱۷۲-۱۶۳.

98. Mahmoudabadi AZ, Dabbagh MA, Fouladi Z. In vitro anti-candida activity of *Zataria multiflora* Boiss. Evid Based Complement Alternat Med 2007;4(3):351-3.

۹۹. گلستانی کلات ز، مروج ز، عزیزی ارانی م، هاتفی س. سمیت تنفسی اسانس اسطوخودوس و آویشن شیرازی بر حشرات کامل سوسک چهار نقطه ای حبوبات. فصلنامه حفاظت گیاهان(علوم و صنایع کشاورزی) جلد ۲۵ شماره ۳. پاییز ۱۳۹۰ : ۲۹۵-۲۸۶.

100. Verdian-rizi MR. Essential oil composition and biological activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. from Iran. Am-Eurasian J Sustain Agric 2008; 2(1): 69-71.

101. Shahnazi M, Azadmehr A, Latifi R, Hajiaghaee R, Saraei M, Alipour M. In vitro protoscolicidal effects of various concentrations of *Ziziphora tenuior* L. extract at different exposure times. Avicenna J Phytomed 2016; 6(4): 376-82.

102. Chachoyan A, Oganessian G. Anti-tumor activity of some species of the family Lamiaceae. Rastit Resur 1996; 32: 59-63.

103. Amiri A, Tayarani-Najaran Z, Karimi G, Mousavi S. Evaluation of *Lavandula angustifolia* cytotoxic and apoptotic effects on human cervical cancer cell line Hela in compare with normal cells. Res Pharm Sci 2012; 7(5): 141- 2.

104. Dalilan S, Rezaei-Tavirani M, Nabiuni M, Heidari-Keshel S, Azodi MZ, Zali H. Aqueous extract of *lavender angustifolia* inhibits lymphocytes proliferation of hodgkin's lymphoma patients. Int J Canc Prev 2013; 6(4): 201- 2.

105. Banerjee PP, Bandyopadhyay A, Harsha SN, Policegoudra RS, Bhattacharya S, Karak N, Chattopadhyay A. *Mentha arvensis* (Linn.)-mediated green silver nanoparticles trigger caspase 9-dependent cell death in MCF7 and MDA-MB-231 cells. Breast Cancer (Dove Med Press) 2017; 9: 265-278.

106. Escobar FM, Cariddi LN, Sabini MC, Reinoso E, Sutil SB, Torres CV, Zanon SM, Sabini LI. Lack of cytotoxic and genotoxic effects of *Minthostachys verticillata* essential oil: studies in vitro and in vivo. Food Chem Toxicol 2012; 50(9): 3062-7.

107. Abaza MS, Orabi KY, Al-Quattan E, Raja'a J. Growth inhibitory and chemo-sensitization effects of naringenin, a natural flavanone purified from *Thymus vulgaris*, on human breast and colorectal cancer. Cancer Cell Int 2015; 15(1):46-7.

108. Machado M, Dinis AM, Santos-Rosa M, Alves V, Salgueiro L, Cavaleiro C, Sousa M. C. Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against Leishmania species. Vet Parasitol 2014; 200(1-2): 39-49.
109. Savini I, Arnone R, Catani MV, Avigliano L. *Origanum vulgare* induces apoptosis in human colon cancer caco2 cells. Nutr Cancer 2009; 61(3): 381-9.
110. Doustar Y, Mohajeri D, Fathiazad F, Namvaran A. Study of apoptosis induced by *Calendula officinalis* extract on experimental colon carcinoma in rats. Med Sci J 2010; 20(1): 1-4.
111. Jimenez-Medina E, Garcia-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. BMC Cancer 2006; 6: 119-20.
112. Senathilake K, Karunanayake E, Samarakoon S, Tennekoon K, de Silva E, Adhikari A. Oleanolic acid from antifilarial triterpene saponins of *Dipterocarpus zeylanicus* induces oxidative stress and apoptosis in filarial parasite *Setaria digitata* in vitro. Exp Parasitol 2017; 177: 13-21.
113. Dai W, Sun C, Huang S, Zhou Q. Carvacrol suppresses proliferation and invasion in human oral squamous cell carcinoma. Onco Targets Ther 2016; 9: 2297-304.
114. Bhakkiyalakshmi E, Suganya N, Sireesh D, Krishnamurthi K, Saravana Devi S, Rajaguru P, Ramkumar K. Carvacrol induces mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells. Eur J Pharmacol 2016; 772: 92-8.
115. Razi M, Shalizar A, Souldouzi R. (R)-(+)-Pulegone-induced damages on ovarian tissue possible mechanisms. Int J Fertil Steril 2016; 10(5): 141-3.
116. Chauhan A, Bahuguna A, Paul S, Kang S. *Thymol* elicits HCT-116 colorectal carcinoma cell death through induction of oxidative stress. Anticancer Agents Med Chem 2017;17:1.
117. Li Y, Wen JM, Du CJ, Hu SM, Chen JX, Zhang SG, et al. Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 2017; 772: 92-8.

۱۱۸. غفوری ح , نصیرزاده ژ, آقامعالی م ر. بررسی القای آپوپتوز از طریق فعال سازی کاسپاز ۹ توسط ترکیب سیلی بینین در رده سلولی HUVEC. دو فصلنامه ی زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس. دوره ۷, شماره ۱, بهار و تابستان ۱۳۹۵, صفحه ۳۰-۲۰.

119. De S, Pan D, Bera A, Sreevatsava V, Bandyopadhyay S, Chaudhuri D, Kumar S, Rana T, Das S, Das SK. In vitro assessment of praziquantel and a novel nanomaterial against protoscolices of *Echinococcus granulosus*. J Helminthol 2012; 86(01): 26-9.

120. Pensel P, Maggiore M, Gende L, Eguaras M, Denegri M, Elissondo M. Efficacy of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on *Echinococcus granulosus*. Interdiscip Perspect Infect Dis vol. 2014, Article ID 693289, 12 pages, 2014. doi:10.1155/2014/693289.

121. Kang JF, Hu HH, Baishanbieke, Chen R, Abulizi. In vitro observation on the apoptosis induced by H₂O₂ in protoscolex of *Echinococcus granulosus*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 2008; 26(5): 332-7.

122. Hajiaghaee R, Monsef-Esfahani HR, Khorramizadeh MR, Saadat F, Shahverdi AR, Attar F. Inhibitory effect of aerial parts of *Scrophularia striata* on matrix metalloproteinases expression. Phytother Res 2007; 21(12): 1127-9.

123. Smyth JD, Barrett NJ. Procedures for testing the viability of human hydatid cysts following surgical removal, especially after chemotherapy. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74(5): 649-52.

Abstract

Background: The herbal plant *Ziziphora tenuior* (*Z. tenuior*) is considered as an appropriate protoscolicidal agent yet the mechanism of such effect is not known so far.

Objective The aim of this study was to evaluate the apoptotic effect of *Z. tenuior* extract on protoscolices of hydatid cyst.

Materials and Methods: The liver of sheep infected with hydatid cyst was obtained from an abattoir in Qazvin (Iran). The protoscolices were aseptically removed and their viability was examined by 0.1% eosin staining technique. The Bradford test was employed to determine the number of protoscolices required for the experiments. Various concentrations of *Z.tenuior* extract (5, 50, and 100 mg/ml) was incubated with hydatid cyst protoscolices at 37 °C and 5% CO₂ for 4 hours. The apoptotic effect of *Z. tenuior* extract on hydatid cyst protoscolices was investigated by determining the activity of caspases 3, 8, and 9 using ELISA-based commercial diagnostic kits.

Results: In the present study, two concentrations (50 and 100 mg/ml) of *Z. tenuior* extract produced apoptosis in the protoscolices of hydatid cyst and this effect was significant by 32.8% and 40.2%, respectively ($p<0.05$). Also, in evaluating the effect of *Z. tenuior* extract on increasing the activity of caspases 3, 8, and 9 in protoscolices, the activity of caspase 3 at 50 and 100 mg/ml significantly increased by 29.99% and 36.01%, respectively ($p<0.05$). Similarly, caspase 9 also demonstrated a significantly increased activity up to 15.23%, and 45.31% at the same concentrations used for caspase 3, respectively ($p<0.05$).

Conclusion: Based on the data found in our study, the extract of the herbal plant *Z.tenuior* produced apoptosis in hydatid cyst protoscolices possibly through increased activity of caspases 3 and 9, yet the exact apoptosis mechanism involved in protoscolices death needs further more in-depth investigation.

Keywords: Hydatid cyst, protoscolex, *Z. tenuior*, Apoptosis, Caspase



Qazvin University of Medical Sciences

**Faculty of medicine dissertation for receiving master's degree in medical
parasitology**

Title:

Investigating the apoptotic effect of Ziziphora tenuior extract on
hydatid cyst protoscolices

Supervisors:

Dr. M. Shahnazi - Dr. A. Azadmehr

Advisors:

Dr. R. Hajiaghaee - Dr. M. Alipour

By:

Hamidreza aghaei

2016-2017

Number thesis: 71